
Zur Strukturvorhersage der Membranproteine: Vergleich der Raumstrukturcharakteristika von Membranproteinen und globulären Proteinen

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologen Peter Hildebrand
geboren am 14.11.1968 in Burglengenfeld

Präsident/Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan/Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Cornelius Frömmel
2. Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann
3. Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2003

Abstract (Deutsch)

Das Auffinden spezifischer Strukturmerkmale integraler Membranproteine ist eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Stabilität und Faltung und die notwendige Voraussetzung zur Modellierung ihrer Raumstruktur. Die Aminosäurezusammensetzung der innerhalb des hydrophoben Bereichs der Membranabschnitte befindlichen α -Helices wird entscheidend durch dieses Milieu determiniert, wie der Vergleich mit β -Barrel Membranproteinen und α -Helices globulärer Proteine zeigt. Die Untersuchung der ϕ -, ψ - und χ_1 -Winkel lieferte gleichwohl eine Reihe von signifikanten Besonderheiten welche speziell bei einigen polaren (Asn, Asp) bzw. aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr) deutlich miteinander korrelieren. Der Anteil kürzerer, der für α -Helices typischen i, i+4 Wasserstoffbrückenbindungen ist innerhalb der Membran insgesamt höher, was ebenfalls mit der Verschiebung der ϕ -, ψ -Winkel korreliert. Die Geometrie von α -Helices integraler Membranproteine ist damit näherungsweise ideal. An den Enden von Membranhelices und in den Helixturns werden neben Pro und Gly häufig polare, amphiphile oder aromatische Aminosäuren gefunden. Die polaren und amphiphilen Aminosäuren liegen überwiegend in den Helixturns und im Bereich der polaren Lipidköpfchen auf der Seite der Helix, welche der Membran zugewandt ist. Zur Fettschicht im Zentrum der Membran hin ragen umgekehrt vorherrschend lipophile Aminosäureseitenketten. Dieser Gradient ist folgerichtig auch an der Aminosäurezusammensetzung der Helixcaps erkennbar, welche die transmembranen Helices zumeist intra- und extrazellulär abschließen. Helixcaps α -helikaler Membrandomänen sind somit spezifische, von den klassischen Caps globulärer Proteine unterscheidbare Struktur motive. Die konsequente Trennung der Untersuchungen der α -helikalen Abschnitte innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht von den Helixenden im polar-wässrigen Milieu ermöglicht außerdem die Identifikation vieler Aminosäurepräferenzen für exponierte (Leu, Ile), oder verdeckte Positionen (Ser, Asn, Cys). Umgekehrt wie bei den α -Helices globulärer Proteine ist die Atomzusammensetzung der Solvent exponierten Aminosäureseitenketten im Zentrum der Membran doppelt so hydrophob wie im Proteininnern.

Eigene Schlagworte:

Membranproteine, Strukturvorhersage, Helixcap, Aminosäurepräferenzen

Abstract (English)

Sorting out structural patterns that are specific for integral membrane proteins is a crucial base for understanding their stability and folding and a valuable source for the modelling of their tertiary structure. The detailed comparison of α -helical with β -barrel membrane proteins and α -helices of globular proteins pointed out, that the amino acid composition of integral membrane proteins is overwhelmingly directed by the influence of the surrounding hydrophobic milieu. Nevertheless the investigation of the ϕ -, ψ - und χ_1 -angles yielded remarkable peculiarities of α -helical membrane proteins that correlate strongly in particular for some polar (asn, asp) and aromatic (trp, tyr) amino acids. The portion of the shorter and stronger i, i+4 H-bonds, that is typically found in α -helices is higher within the borders of the membrane. This observation confirms the observed shift of the ϕ - and ψ - angles as well. Consequently the geometry of α -helices in membrane proteins is nearly ideal. At the ends of α -helices and in the turns of integral membrane proteins pro, gly and those amino acids are predominant that contain polar, amphiphilic or aromatic side chains. Whilst the aromats are equally positioned at the protein inside, the polar or amphiphilic amino acids are largely found at the helix turns, or at the side of the helix that contacts the polar lipid head groups. In contrast merely hydrophobic side chains face the lipophilic tails of the fatty acids in the core of the membrane. This gradient consequently shapes the amino acid composition of the helix caps that frequently coat the transmembrane helices on both sides of the membrane, too. Hence helix caps of transmembrane domains are substantially specific structural patterns that must be distinguished from the classical caps, known from α -helices of globular proteins. The clear distinction of the α -helical parts that are in contact with the lipophilic tails of the fatty acids, from the helix ends that stretch out into the polar aqueous solvent, advances the identification of amino acid preferences either lipid-exposed (Leu, Ile) or protein-buried (Ser, Asn, Cys). Finally, in sharp contrast to the helices of globular proteins, in the core of the membrane, the atomic composition of the solvent exposed amino acid side chains is twice as hydrophobic as inside the protein.

Keywords:

Membrane protein, structure prediction, helixcap, amino acid preference

Abkürzungen

A	<i>Å</i>	Ångström
	<i>ATP</i>	Adenosintriphosphat
B	<i>BSE</i>	Bovine Spongiform Encephalopathy
C	<i>C', C'', ..</i>	Abkürzungen für Helix-cappositionen
	<i>>C=O</i>	Carbonylgruppe
D	<i>DIP</i>	Dictionary of Interfaces in Proteins
E	<i>EGF</i>	Epidermaler Wachstums Faktor
	<i>EM</i>	extramembranös
F	<i>ER</i>	Endoplasmatisches Retikulum
	<i>FTIR</i>	Fourier-Transformation Infrarot Spektroskopie
G	<i>G°</i>	freie Standard-Enthalpie
	<i>g⁺, g⁻</i>	gauche ⁺ , gauche
	<i>GABA</i>	γ-Aminobuttersäure
	<i>glob</i>	globulär
	<i>GPCR</i>	G-Protein gekoppelter Rezeptor
	<i>GPI</i>	Glycosylphosphatidylinositol Anker
H	<i>HH</i>	Helix-Helix Kontakt
	<i>HS</i>	Helix-Solvent Kontakt
I	<i>IR</i>	Infrarot Spektroskopie
	<i>i, i+3 (4, 5)</i>	Aminosäureposition i und i+3 (4, oder 5) innerhalb einer Helix
K	<i>kD</i>	Kilo Dalton
L	<i>L, l</i>	Länge

M	<i>lip</i>	lipophil (<i>lip</i> = im lipophilen Mileu)
	<i>memb</i>	membranös
N	<i>MHC</i>	Haupthistokompatibilität-skomplex
	<i>N, n</i>	Anzahl
	<i>N1, N2, ..</i>	Abkürzungen für Helix-cappositionen
	<i>>N-H</i>	Aminogruppe
	<i>Nin-Cin</i>	Topologie: N- und C-Terminus intrazellulär
	<i>NMR</i>	Kernspin Resonanz Spektroskopie
O	<i>Omp...</i>	Outer Membrane Protein
P	<i>P</i>	Präferenz
	<i>PDB</i>	Protein Daten Bank
	<i>PD_{loc}</i>	lokale Packungsdichte
	<i>pol</i>	polar (<i>pol</i> = im polaren Mileu)
R	<i>RMSD</i>	Root Mean Square Deviation
T	<i>t</i>	trans
	<i>TM</i>	transmembranös
V	<i>VBA</i>	Visual Basic Application (Excel 2002)
	<i>V_{tot}</i>	Gesamtes Volumen des Atoms
	<i>V_{vdW}</i>	Van der Waals Radius
	<i>X-Ray</i>	Röntgenstrahlen
X	<i>Ø</i>	Durchschnitt
	<i>φ, ψ und χ₁</i>	Cα-C, N-C und Cα-Cβ Winkel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung:	7
1.1	<i>Allgemeiner Teil</i>	7
1.1.1	Die biologische Bedeutung von Membranproteinen	7
1.1.2	Methoden zur Charakterisierung von Membranproteinen	7
1.1.3	Problemstellung	9
1.2	<i>Die Strukturdaten</i>	10
1.2.1	β -Barrels	10
1.2.1.1	Der aktuelle Datensatz	10
1.2.1.2	Die Strukturmerkmale	11
1.2.2	α -helikale Membranproteine	12
1.2.2.1	Der aktuelle Datensatz	12
1.2.2.2	Die Strukturmerkmale	14
1.3	<i>Biosynthese von Membranproteinen</i>	17
1.3.1	Das Zwei Phasen Model	17
1.3.2	Der Ribosom-Translokation Komplex	19
1.4	<i>Einfluss der Membran</i>	21
1.4.1	Die Struktur der Membranen	21
1.4.2	Die Sortierung von Membranproteinen im Golgi Apparat	22
1.4.3	Was passiert bei einem „Hydrophobic Mismatch“?	23
1.4.3.1	Anpassung der Membran an das Protein	23
1.4.3.2	Anpassung des Proteins an die Membran	25
1.5	<i>Vorhersage von Membranproteinen</i>	26
1.5.1	Vorhersage der Sekundärstruktur	26
1.5.1.1	Vorhersage α -helikaler TM-Abschnitte	26
1.5.1.2	Sekundärstrukturvorhersage von β -Barrel Membranproteinen	30
1.5.1.3	Sekundärstrukturvorhersage von Kanalproteinen und Transportern	31
1.5.2	Vorhersage der Tertiärstruktur	33
1.5.2.1	Die Grundlagen von Struktur basierten Vorhersagemethoden	33
1.5.2.2	Homologiemodellierung von Membranproteinen	35
1.6	<i>Aufgabenstellung</i>	36
2	Methoden	37
2.1	<i>Die Helixcaps</i>	37
2.1.1	Typisierung von Helixcaps	37
2.1.2	Berechnung der normalisierten Aminosäurepräferenzen	38
2.1.3	Statistische Bewertung der Aminosäurepräferenzen	39
2.2	<i>Abmessung helikaler TM-Abschnitte</i>	40
2.2.1	Bestimmung der Position des Membran-Wasser Interfaces	40
2.2.2	Berechnung der Membran-Durchschnittsebenen und der Ganghöhe der Helix	41
2.2.3	Modellierung von fehlenden Wassern und polaren Lipidköpfchen	42
2.3	<i>Der Referenzdatensatz</i>	43
2.4	<i>Die Analyse der Protein-Kontaktflächen</i>	43
2.4.1	Die Berechnung der Protein-Kontakte	43
2.4.2	Normalisierung der Aminosäuren-Häufigkeiten	45
2.4.3	Die Berechnung der lokalen Dichte	46
2.5	<i>Die Helixgeometrie</i>	46
2.5.1	Definition der Torsionswinkel	46
2.5.2	Gegabelte Wasserstoffbrückenbindungen	47
2.5.3	Definition der Sekundärstrukturelemente	47
2.5.4	Statistische Bewertung der Ergebnisse	48
2.6	<i>Datenverarbeitung und graphische Darstellung</i>	48

3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	<i>Die Helixcaps</i>	49
3.1.1	Ergebnisse.....	49
3.1.1.1	Helixcaps in der hochaufgelösten Struktur des Bakteriorhodopsin.....	49
3.1.1.2	Aminosäurepräferenzen in den Helixcaps von Membranproteinen.....	51
3.1.2	Diskussion.....	55
3.1.2.1	Aminosäurepräferenzen in den Helixcaps von Membranproteinen.....	55
3.1.2.2	Helixcaps sind konservierte Struktur motive.....	59
3.2	<i>Abmessungen α-helikaler Membrandomänen</i>	60
3.2.1	Ergebnisse.....	60
3.2.1.1	Durchschnittslänge einer TM-Helix und der Helixenden.....	60
3.2.1.2	Ganghöhe der untersuchten TM-Helices.....	61
3.2.2	Diskussion.....	61
3.2.2.1	Länge einer TM-Helix im Verhältnis zur Membrandicke.....	61
3.3	<i>Aminosäurezusammensetzung helikaler TM-Abschnitte.....</i>	62
3.3.1	Ergebnisse.....	62
3.3.1.1	Aminosäurezusammensetzung von α -Helices und β -Barrels im Vergleich.....	62
3.3.2	Diskussion.....	64
3.3.2.1	Die Aminosäurekomposition ist vorwiegend vom Milieu abhängig.....	64
3.3.2.2	Gly ist eine hydrophobe Aminosäure.....	65
3.3.2.3	Die enorme Bedeutung von Pro für α -helikale Membranproteine.....	66
3.4	<i>Packungsanalyse α-helikaler Membrandomänen.....</i>	69
3.4.1	Ergebnisse.....	69
3.4.1.1	Aminosäurezusammensetzung der Kontakte α -helikaler Membrandomänen.....	69
3.4.1.2	Packungsdichte α -helikaler Membrandomänen.....	71
3.4.1.3	Atomzusammensetzung der Kontaktflächen α -helikaler Membrandomänen.....	72
3.4.2	Diskussion.....	73
3.4.2.1	Polare Wechselwirkungen α -helikaler Membrandomänen.....	73
3.4.2.2	Van der Waals Wechselwirkungen α -helikaler Membrandomänen.....	74
3.4.2.3	Kontaktpräferenzen einzelner Aminosäuren α -helikaler Membrandomänen.....	75
3.5	<i>Geometrie α-helikaler TM-Abschnitte.....</i>	77
3.5.1	Ergebnisse.....	77
3.5.1.1	Die Hauptkettenwinkel (ϕ - und ψ -Winkel).....	77
3.5.1.2	Die Seitenkettenwinkel (χ_1 -Winkel).....	81
3.5.1.3	I, i+4 Hauptkettenwasserstoffbrücken.....	84
3.5.1.4	Gegabelte Hauptkettenwasserstoffbrücken.....	84
3.5.1.5	π -Helices und Knicke in den Membranhelices.....	85
3.5.2	Diskussion.....	86
3.5.2.1	Korrelation der Haupt- und Seitenkettenwinkel α -helikaler TM-Abschnitte.....	86
3.5.2.2	Wasserstoffbrückenbindungen bei α -helikalen TM-Abschnitten.....	86
3.5.2.3	Vergleich mit der Aminosäurekomposition von α -helikalen TM-Abschnitten.....	87
3.5.2.4	Geometrische Besonderheiten α -helikaler TM-Abschnitte.....	87
4	Literaturverzeichnis.....	90

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

1.1.1 Die biologische Bedeutung von Membranproteinen

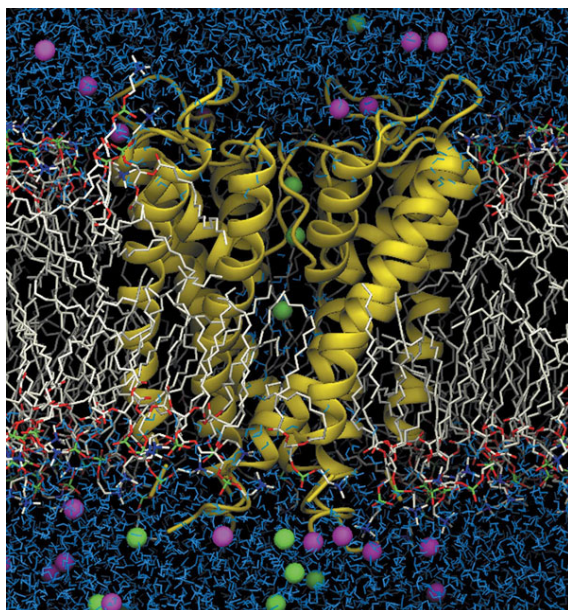
Die Zelle ist der Grundbaustein von Lebewesen. Biomembranen grenzen die Zellen nach Außen ab und schaffen im Zellinnern unterschiedliche und voneinander getrennte Reaktionsräume. Die spezifische Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten erfolgt über membrangebundene bzw. die Membran durchspannende Proteine (TM-Proteine) und Proteinkomplexe (s. Lehrbücher, z. B. Stryer).

Die zentrale Bedeutung von Membranproteinen lässt sich besonders prägnant aus genetischer und pharmazeutischer Sicht verdeutlichen: Fast ein Drittel der bekannten Gensequenzen kodieren Membranproteine, die mehr als die Hälfte aller möglichen Angriffspunkte (Drug Targets) für innovative Therapeutika darstellen [1, 2]. Die Kenntnis der Struktur-Funktions-Beziehung dieser Proteine ist daher von zentraler Bedeutung für die Medizin und die Pharmakologie. Dazu ist es notwendig, die räumliche Struktur dieser meist sehr großen Biomoleküle bis hinein in molekulare Details aufzuklären.

1.1.2 Methoden zur Charakterisierung von Membranproteinen

Eine Vielzahl biochemischer bzw. gentechnischer [3] und biophysikalischer bzw. struktureller Methoden (IR, NMR, FTIR) [4] werden verwendet, um Membranproteine bzw. Teile davon näher zu charakterisieren. Für Moleküle in der Größenordnung von Membranproteinen (>20 kD) können detaillierte Strukturinformationen bisher nur mit Hilfe von Elektronenmikroskopie, bzw. Röntgenstrahlbeugung (X-Ray) aus Proteinkristallen gewonnen werden (Abbildung 1).

Abbildung 1: Strukturmodell des Natriumkanals von *Streptomyces lividans* (1jvm) [5]



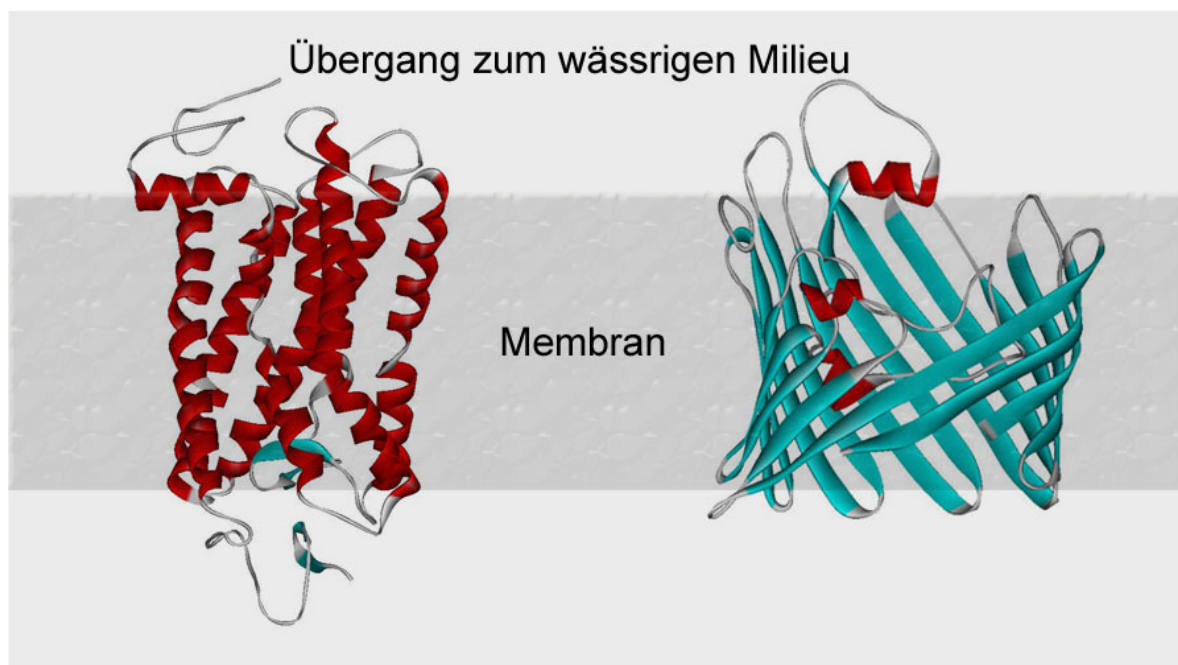
Mit Hilfe von Röntgenstrahlbeugung gewonnene Struktur des Natriumkanals (gelb) von *Streptomyces lividans* [5]: Die Einbindung des Proteinkanals in die Membran erfolgte mit Hilfe einer Computersimulation und zeigt Natrium als grüne und Kalium als violette Kugeln [6]. Die TM-Helices reichen über den hydrophoben Membranabschnitt (grau) hinaus und kommunizieren mit den polaren Lipidköpfchen (rot) und dem Wasser (blau). Um Proteinkristalle zu erhalten muss die natürliche Umgebung der Proteinstruktur möglichst gut nachgeahmt werden.

Dazu müssen ausreichend große Mengen an Protein exprämiert bzw. in aufwendigen Reinigungsschritten aus natürlichem Zellmaterial gewonnen werden. Membranproteine lassen sich auf Grund ihres amphiphilen Charakters äußerst schlecht präparieren und obwohl eine Vielzahl unterschiedlicher Medien zur Nachahmung der Membrenumgebung vorliegen, ist deren Kristallisation keineswegs Routine [7].

Bioinformatische Methoden sind deshalb nicht nur eine etablierte Technik zur Aufarbeitung der riesigen Datenmengen, die derzeit durch die Sequenzierung (z. B. des menschlichen Genoms) anfallen, sondern ein grundlegendes Mittel der Proteinstrukturforschung [8]. Die 3D-Struktur Vorhersage von Membranproteinen ist eine der größten Herausforderung für diesen Wissenschaftszweig, denn die Zielsetzung ist die Überbrückung, bzw. Verkleinerung der tiefen Kluft zwischen Verfügbarkeit von Strukturmerkmalen und der ausgesprochen großen biologischen Relevanz dieser Strukturklasse [9].

Der Strukturraum ist durch die Bindung an die Membran eingeschränkt und die vorherrschenden Architekturen der TM-Domänen von rein α -helikal, bzw. rein β -Faltblatt erleichtern die Sekundär- und die Tertiärstrukturvorhersage (Abbildung 2). Die wenigen verfügbaren hochaufgelösten Membranproteinstrukturen repräsentieren allerdings erst einen Bruchteil der möglichen Faltungseinheiten („folds“) [1].

Abbildung 2: Die beiden vorherrschenden Struktur motive bei Membranproteinen



Die Darstellung zeigt die beiden vorherrschenden Struktur motive von Membranproteinen eingefärbt nach Sekundärstrukturtypen: Die extrazellulären Abschnitte sind in dieser Graphik unten.

a) Rhodopsin ist ein Beispiel für ein α -helikales 7-Bündel Membranprotein

b) und Maltoporin für eine β -barrel Struktur.

1.1.3 Problemstellung

Rechnergestützte Verfahren zur Vorhersage der Tertiärstruktur von Membranproteinen sind bisher ähnlich derer wasserlöslicher globulärer Proteine nur bei hoher Sequenzidentität erfolgreich. Die gewonnenen Regeln aus der Vorhersage der Struktur von wasserlöslichen globulären Proteinen sind zudem nur bis auf ein begrenztes Maß auf Membranproteine übertragbar [3]. In Tabelle 1 sind darum einige wesentliche Unterschiede zwischen dem wässrigen und dem hydrophoben Milieu aufgelistet, welche für die Proteinfaltung und Stabilität eine Rolle spielen.

Gegenstand dieser Arbeit ist deshalb die systematische strukturelle Analyse α -helikaler Membranproteine und besonders das Auffinden spezifischer Merkmale zur Differenzierung dieser Strukturgruppe von wasserlöslichen globulären Proteinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als Hinweis bzw. zum genaueren Verständnis der Einflüsse bei der Entstehung und Stabilisierung von Membranproteinen und stellen besonders eine Grundlage zur Verbesserung bestehender und entstehender Proteinstrukturvorhersageprogramme dar.

Tabelle 1: Wichtige Eigenschaften der cytosolischen und der Membranumgebung für die Proteinfaltung

Eigenschaft	Cytosol	Plasmamembran
Heterogenität des Solvents	Groß	Gering
Chemische Gruppen	HOH, Ionen, -SH	-CH ₃ , -CH ₂ , =CH-
Isotropie	Weitgehend Ja	Nein
PH Gradient	Nein	Ja ^(a)
Elektrisches Feld	$\sim 0 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$	$\sim 2 \cdot 10^6 \text{ V} \cdot \text{m}^{-1}$ ^(a)
Druck Gradient	Nein	Ja
Gradient der Dielektrischen Konstanten	Nein	Ja
Gradient des Redoxpotentials	Nein	Ja
Volumenanteil des Proteins	$\sim 17 \%$	$\sim 35 \%$
Abstand zwischen zwei Proteinen	$\sim 50 \text{ \AA}$	$\sim 30-35 \text{ \AA}$
Dazwischengelagerte Solventmoleküle	$\sim 15-20$	$\sim 30-35$
Austauschzeit zwischen zwei Solventmolekülen ^(b)	$\sim 10^{-11} \text{ s}$	$\sim 10^{-7} \text{ s}$
Viskosität (η) bei 20°C	$0,001 \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$	$0,1 \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$
Dimensionen	3	~ 2
Laterale Diffusion D_{lat} eines 50-kDa Proteins ^(b)	$\sim 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$\sim 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
Dielektrische Konstante (ϵ)	80	$\sim 1-2$ (-40 ^(c))
ΔG° Brechen einer Hauptkettenwasserstoffbrücke	$\sim 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$+4 - 6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
ΔG° Deprotonierung einer Glu Seitenkette (pH7)	$-4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$> +30 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
ΔG° Öffnung einer Salzbrücke	$< 1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$+60 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
ΔG° Exponieren von 1 \AA^2 hydrophober Oberfläche	$+0,025 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\sim 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
ΔG° Exponieren einer Leu Seitenkette zum Solvent	$+2,8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\sim 0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
ΔG° Exponieren zweier 50-kDa Proteine	$8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$	$5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die angegebenen Eigenschaften beziehen sich auf das Zentrum der Membran und sind aus [10]. ^(a) Ausnahme: Porine; ^(b) reines Solvent; ^(c) im Bereich der polaren Lipidköpfchen [11]

1.2 Die Strukturdaten

1.2.1 Beta-Barrels

1.2.1.1 Der aktuelle Datensatz

Im Brennpunkt dieser Arbeit stehen die dreizehn nicht homologen α -helikalen Membranproteine, deren hochaufgelöste molekulare Strukturen bis zum jetzigen Zeitpunkt veröffentlicht sind (Tabelle 3). Zusammen mit den bekannten β -barrel Proteinstrukturen (Tabelle 2) sind damit für insgesamt 31 Membranproteinfamilien detaillierte strukturelle Details verfügbar (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>) [12].

Der aktuelle Datensatz besitzt aber noch einen deutlichen Bias zu Membranproteinstrukturen mit guter Kristallisierbarkeit und vielleicht auch überdurchschnittlich hoher Stabilität [13], beinhaltet aber andererseits bereits eine Reihe wichtiger Enzyme mit unterschiedlichen Funktionen (Tabelle 3):

Tabelle 2: Bekannte β -Barrel Strukturen

β-Fässer	Organismus	Res [Å]	PDB	Autor, Jahr
1) Porine aus 16 Faltblättern				
Porin	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1,8	2por*	[14]
Porin	<i>Rhodopseudomonas blastica</i>	2,0	1prn	[15]
Ompf (Matrixporin)	<i>Escherichia coli</i>	3,2	1opf	[16]
PhoE (Phosphoporin)	<i>Escherichia coli</i>	3,0	1pho	[17]
OmpK36 (Osmoporin)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,2	1osm	[18]
Omp32	<i>Comamomonas acidovorans</i>	2,1	1e54	[19]
2) Porine aus 18 Faltblättern				
Maltoporin	<i>Escherichia coli</i>	2,4	2mpr	[20]
Maltoporin	<i>Escherichia coli</i>	3,1	1mpr	[21]
ScrY (Sucrose spezifisches Porin)	<i>Salmonella typhimurium</i>	2,4	1a0t	[22]
3) Rezeptor aus 22 Faltblättern				
FhuA (Ferrychrom Transport)	<i>Escherichia coli</i>	1,9	1by5	[23]
FhuA (Ferrychrom Transport)	<i>Escherichia coli</i>	2,7	1fcp	[24]
FepA	<i>Escherichia coli</i>	2,4	1fep	[25]
4) Alpha-Hemolysin				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,9	7ahl	[26]
5) β-barrel Membrananker aus 8 Faltblättern				
OmpA	<i>Escherichia coli</i>	2,5	1bxw	[27]
OmpX	<i>Escherichia coli</i>	1,9	1qj8	[28]
6) β-barrel Membrananker aus 12 Faltblättern				
OMPLA (Phospholipase)	<i>Escherichia coli</i>	2,2	1qd5	[29]
5) TolC Kanal (3x 4β- Faltblätter)				
OmpA	<i>Escherichia coli</i>	2,1	1ek9	[30]
6) β-barrel Protease aus 10 Faltblättern				
OmpT	<i>Escherichia coli</i>	2,6	1i78	[31]

*Die Strukturdaten der fett gekennzeichneten PDB- Dateien [32] wurden zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung in Tabelle 10 verwendet.

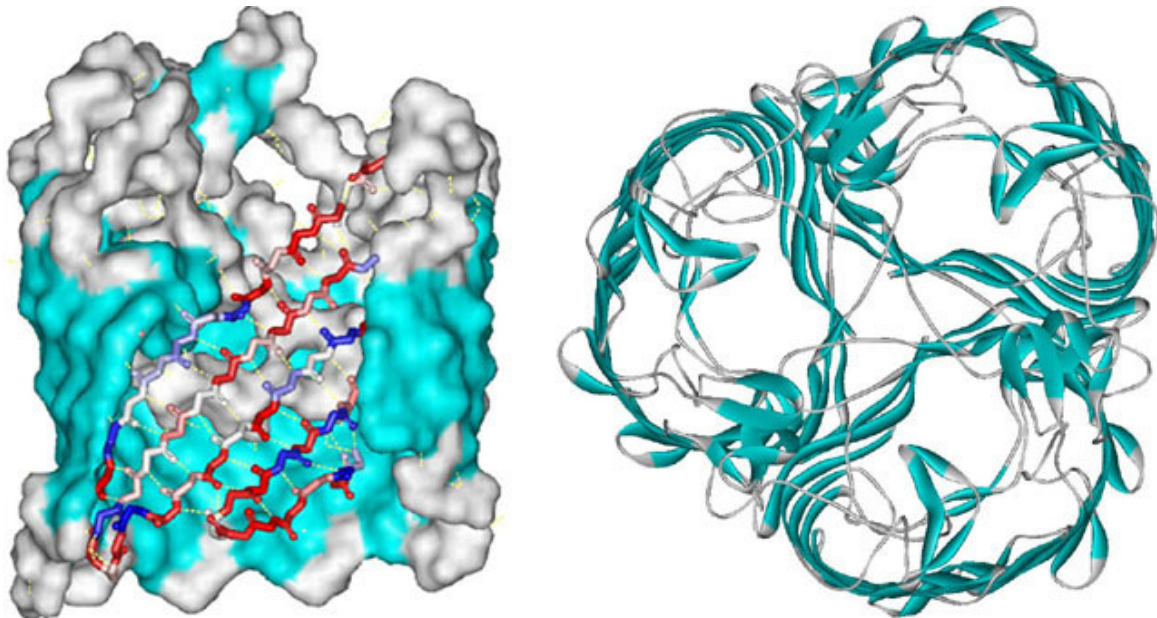
1.2.1.2 Die Strukturmerkmale

Die 18 derzeit bekannten nicht homologen hoch aufgelösten wassergefüllten β -barrel Strukturen (Tabelle 2) erfüllen entscheidende Transportfunktionen in der äußeren Membranen von Bakterien [33]. Bei dieser Strukturgruppe sind einzelne durch Loops verbundene β -Faltblätter lateral durch starke Wasserstoffbrücken zu stabilen Poren verknüpft [34]. Diese Kontaktstellen sind deshalb relativ weit in der Primärstruktur voneinander entfernt liegende Aminosäuren.

Diese Strukturgruppe verfügt vielleicht deshalb über eine beeindruckende strukturelle Plastizität die sich in der Anordnung zu Poren von unterschiedlichster Größe manifestiert. Bakterielle Toxine perforieren nach spontaner Insertion als homomultimere Fässer die Wirtsmembran [35] und werden auf Grund ihrer strukturellen Wandelbarkeit mit dem BSE Erreger in Zusammenhang gebracht [36] (Abbildung 20).

Innerhalb der Membrangrenzen weist nur jede zweite in der Regel hydrophobe Aminosäure zur Membran. Dazwischen liegt häufig jeweils eine hydrophile Aminosäure, welche die Wand des Kanals auskleidet [37, 38]. Die β -Barrel verfügen demnach über ein anderes Repertoire an Aminosäuren als α -helikale Membranproteine, deren TM-Abschnitte fast ausschließlich aus hydrophoben Resten zusammengesetzt sind und werden deshalb in dieser Arbeit als Referenzgruppe verwendet (Tabelle 10).

Abbildung 3: Maltoporin in der Seitenansicht und ein Porintrimer in der Aufsicht (2mpr)



Die Voraussetzung zur Faltung zu β -Fässern ist ein Aminosäuremuster welches lokal in einem Zweierhythmus von polar (rotfarben, Ausrichtung zum Kanal) zu unpolar (blaufarben, Ausrichtung zur Lipiddoppelschicht) alterniert und global ein seitliches Zusammenfügen der β -Faltblätter (türkis) über Wasserstoffbrücken (gelb) ermöglicht.

1.2.2 alpha-helikale Membranproteine

1.2.2.1 Der aktuelle Datensatz

Die Daten

Tabelle 3: Verwendeter Datensatz hoch aufgelöster nicht homologer α -helikaler Membranproteine

Helikale Proteine	Organismus**	Res*	PDBcode	Autor, Jahr
1) Bakteriell Rhodopsin (1c3w:1,00, 1e12:0,45, 1jgj:0,38)				
Bakteriorhodopsin	<i>Halobacterium salinarum</i>	1,6	1c3w	[39]
Halorhodopsin	<i>Halobacterium salinarum</i>	1,9	1e12	[40]
Sensory Rhodopsin	<i>Natronobacterium pharaonis</i>	2,4	1jgj	[41]
2) G-Protein gekoppelter Rezeptor				
Rhodopsin	<i>Bos Taurus</i>	2,8	1f88	[42]
3) Photosynthetisches Reaktionszentrum (1aig:1,00, 1eys: 0,67, 1prc:0,41)				
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	2,2	1aig	[43]
	<i>Thermochromatium tepidum</i>	2,2	1eys	[44]
	<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	2,3	1prc	[45]
4) Photosystem 1				
	<i>Synechococcus elongatus</i>	2,5	1jb0	[46]
5) Bakterieller Lichtsammelnder Komplex				
Lichtsammelnder Komplex II	<i>Rhodospirillum molischianum</i>	2,4	1lgh	[47]
	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	2,5	1kzu	[48]
Lichtsammelnder Komplex III	<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	3,0	1ijd	[49]
6) Cytochrome c Oxidase / Atmungskomplex IV / Ubiquinol Oxidase				
Cytochrom C Oxidase	<i>Paracoccus denitrificans</i>	2,7	1ar1	[50]
	<i>Thermus thermophilus</i>	2,4	1ehk	[51]
	<i>Bos Taurus</i>	2,3	2occ	[52]
Ubichinol Oxidase	<i>E. coli</i>	3,5	1fft	[53]
7) Cytochrome bc1 / Atmungskomplex III				
	<i>Bos Taurus</i>	3,0	1be3	[54]
	<i>Gallus gallus</i>	3,2	1bcc	[55]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,3	1ezv	[56]
8) Fumaratreduktase/ Succinatdehydrogenase / Atmungskomplex II				
	<i>E. coli</i>	3,3	1fum	[57]
	<i>Wolinella succinogenes</i>	2,2	1qla	[58]
9) Kalium Kanal				
	<i>Streptomyces lividans</i>	2,8	1jvm	[59]
10) Mechanosensitiver Ionenkanal				
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3,5	1msl	[60]
11) Aquaporine und Verwandte				
Glycerol Facilitator GlpF	<i>E. coli</i>	2,7	1fx8	[61]
Aquaporin	<i>Homo sapiens</i>	3,8	1fqy	[62]
	<i>Bos taurus</i>	2,2	1j4n	[63]
12) Chlorid Kanal				
	<i>Salmonella typhimurium</i>	3,5	1kpk	[64]
	<i>Escherichia coli</i>	3,0	1kpl	[64]
13) P- type ATPase				
	<i>Oryctolagus Cuniculus</i>	2,6	1eul	[65]

*Auflösung ** jeweils Struktur mit bester Auflösung

Die Membranproteinfamilien

Die 7- Helix Bündel Membranprotein Familie

1-2) Die prominente Strukturfamilie der G-Protein gekoppelte Rezeptoren reicht Signale über die Membrangrenzen weiter und besitzt insbesondere beim Menschen entscheidende sensorische und regulatorische Eigenschaften (<http://www.gpcr.org>). Als Modellsystem für diesen wichtigen Proteintypus diente dafür lange Zeit das Bakteriorhodopsin. Diese Protonenpumpe aus der Purpurmembran von *Halobacterium salinarium* gehört ebenso wie die jetzt verfügbare Struktur des Rinder-Rhodopsins zur großen Familie der 7-Helixbündel Membranproteine (Abbildung 2, Abbildung 13, Abbildung 46).

Membranproteine der Photosynthese und des Kohlenhydratabbaus

3-8) Die Photosynthese und der Kohlenhydratabbau werden durch Proteine in den Chloroplasten- (Abbildung 5) und Mitochondrienmembranen (Abbildung 7) gesteuert. Für diese Strukturfamilien gibt es ebenso wie für das Bakteriorhodopsin eine Vielzahl von Strukturdaten [12]. In dieser Arbeit fanden deshalb die Strukturen mit der jeweils höchsten Auflösung Verwendung. Für einige Abbildungen und Analysen wurde aber vereinzelt auch auf Strukturen mit geringerer Auflösung zurückgegriffen.

Bekannte Strukturen von Kanalproteinen

9-12) Der mechanosensitive Rezeptor aus der Membran von *Mycobacterium tuberculosis* kann als Prototyp einer Reihe äußerst wichtiger Kanäle dienen: Bei elastischer Verformung der Membran führen Scheerbewegungen der Helices wahrscheinlich zur Öffnung des Kanals [66] (Abbildung 14). Ein ähnlicher Mechanismus öffnet vielleicht die ligandengesteuerten Acetylcholin-, GABA-, Serotonin- und Glycinrezeptorkanäle, welche ebenfalls eine pentamere Architektur besitzen [67, 68].

Mehrere Strukturen und auch der genauere Öffnungsmechanismus des über die Membranspannung kontrollierten Na⁺-Kanals wurden mit unterschiedlich hoher Auflösung ebenfalls mit Hilfe von Röntgenstrahlbeugung ermittelt (Abbildung 1). Dieses Protein ist aus vier sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut, welche die Lipiddoppelschicht durchspannen und eine Pore ausbilden. Kristallstrukturen gibt es jetzt auch für Aquaporine (Abbildung 15) und für den Chloridkanal (Abbildung 6). Alle Membrankanäle formieren sich bei Aktivierung zu homomultimeren Strukturen [69].

Transportproteine

13) Der aktive Transport von Ca²⁺-Ionen aus den Muskelzellen zurück in das Sarkoplasmatische Retikulum wird durch die Calcium Pumpe, eine P-Typ ATPase gewährleistet. Der Vergleich von elektronenmikroskopischen und mit Röntgenstrahlbeugung gewonnenen Strukturdaten bis zu einer Auflösung von 2,6 Å, belegt die Notwendigkeit größerer Bewegungen innerhalb der Proteindomänen während des aktiven Transports [65].

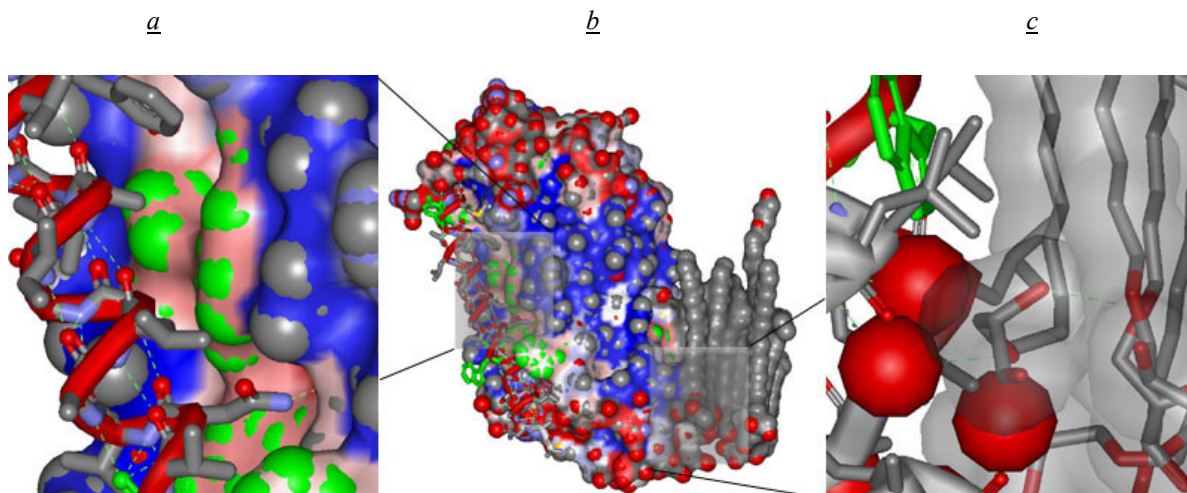
1.2.2.2 Die Strukturmerkmale

Kompatibilität der Oberflächen

Das Kräftespiel bei der Faltung und Stabilisierung von α - Helices in der Membran ist völlig anders als bei der Gruppe der β - Faltblätter [70]. Die Sekundärstruktur Helix wird durch lokale Wechselwirkungen innerhalb derselben konsolidiert [38, 71, 72]. Die Adhäsionskräfte zwischen den Helices sind entsprechend nicht durch ein Raster von Wasserstoffbrückenbindungen geprägt, obwohl elektrostatische Wechselwirkungen bei der Ausformung der Tertiärstruktur eine wichtige Rolle spielen können [73].

Die räumliche Struktur der interagierenden Oberflächen [74, 75, 76] wird bei α - helikalen Membranproteinen neben den dabei auftretenden van der Waals Kräften [77] zur entscheidenden Triebfeder der Faltung. Diese Wechselwirkungen bestimmen die dreidimensionale Gestalt von Membranproteinen in nachweisbarem Maß [78] und führen selbst nach Eliminierung von konvektiven Loops zur Ausformung einer funktionellen Einheit des Bakteriorhodopsin [79, 80, 81].

Abbildung 4: Kristallstruktur des Halorhodopsin als Protein- Lipid- Wasserkomplex (1e12).



a) Die Proteinoberfläche ist entsprechend der Hydrophobizität (blau), Polarität (rot) und Aromatizität (grün) gefärbt. Diese Detailansicht zeigt eine Helix- Helix Kontaktfläche in der Membran. In Helix- Helix Kontakten können π -Elektronenringe stabilisierend miteinander wechselwirken. Diese Kontaktflächen sind aber im Besonderen durch die geometrische Kompatibilität der beteiligten Partner Helices ausgezeichnet: Größere Seitenketten passen in die Aussparungen kleinerer Aminosäuren in der benachbarten Helix.

b) Die blau gefärbten Oberflächenabschnitte sind in der natürlichen Membrenumgebung in engem Kontakt mit den Kohlenwasserstoffketten der Lipiddoppelschicht (grau). Die delokalisierten π -Elektronenringe aromatischer Aminosäuren sind (wahrscheinlich auf Grund besonderer geometrischer und elektrostatischer Eigenschaften) sehr häufig als aromatischer Gürtel zwischen dem hydrophoben und dem polaren Milieu zu finden.

c) Vergrößerung der engen Kontakte zwischen dem Protein und Lipiden, bzw. Wassermolekülen im Übergangsbereich zum polaren Milieu (Wasser als rote Kugeln, gebundener Sauerstoff ebenfalls rot).

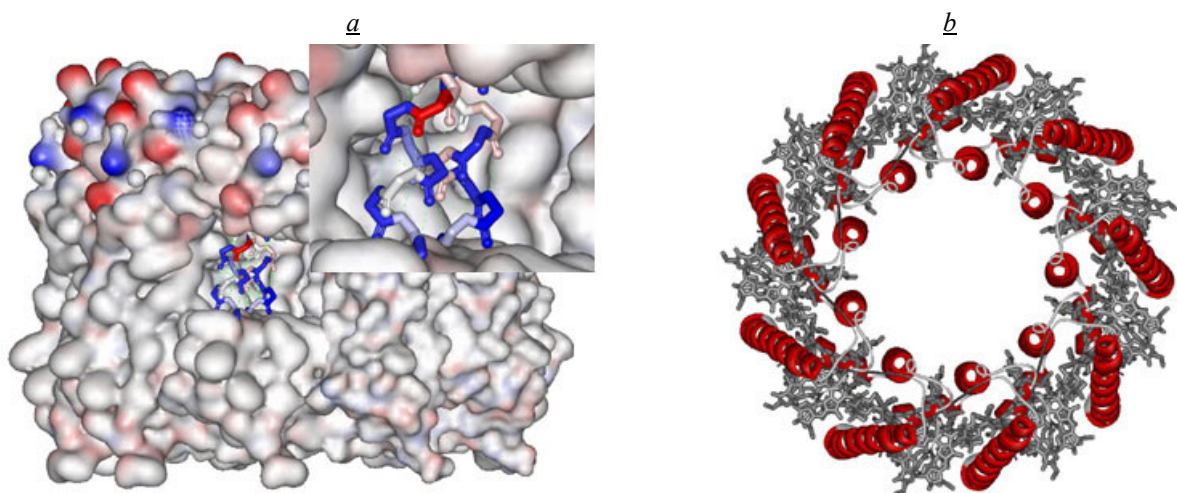
Wechselwirkung mit Liganden

Membranproteine denaturieren (z. B. bei Zufuhr von Hitze) in der Regel nicht vollständig innerhalb des lipophilen Milieus. Daher sind einfache thermodynamische Untersuchungen u. a. zur Faltung und Entfaltung wie im Falle wasserlöslicher globulärer Proteine kaum möglich. Ein Grund ist die hohe Beständigkeit der α -Helix innerhalb der Membran, induziert durch die regelmäßige Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) zwischen den Hauptkettenatomen [82].

Die einzelnen Faltungsschritte während der Assemblierung eines Membranproteins (Abbildung 8) werden daher in mehr oder weniger aufwendigen Experimenten getrennt voneinander untersucht (Tabelle 1). Der Aufbau des Ergebnisteils in dieser Arbeit folgt daher diesem Schema. Die H-Brücken, welche zur Ausbildung der Sekundärstrukturen führen, werden getrennt von den übrigen Parametern (z. B. Interaktion der Helix Enden, Loops mit der Membran), welche das Protein im fertigen Zustand stabilisieren, analysiert (Tabelle 15).

Im funktionstüchtigen Protein ist der Anteil der neu geknüpften Kontakte zwischen benachbarten TM-Helices bzw. zwischen diesen Helices und eingelagerten prosthetischen Gruppen höher, als zur Lipiddoppelschicht. Der Lichtsammelnde Komplex ist deshalb ein gutes Beispiel für ein Membranprotein, dessen Stabilität weitgehend auf die Wechselwirkung mit den unterschiedlichen Chlorophyllen zurückzuführen ist. Neben den bereits erwähnten van der Waals Wechselwirkungen wird dieser Homomultimer außerdem durch fünf Wasserstoffbrücken pro Untereinheit und drei zwischen den Untereinheiten stabilisiert [47].

Abbildung 5: Der bakterielle Lichtsammelnde Komplex in verschiedenen Ansichten (1lgh)



a) Die Proteinoberfläche ist nach Elektrostatik eingefärbt, wobei blau und rot, positive und negative Ladungen bedeuten. Der vergrößerte Helix Ausschnitt bedient sich der Farben aus Abbildung 3. Die Helices sind durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen (grün) stabilisiert.

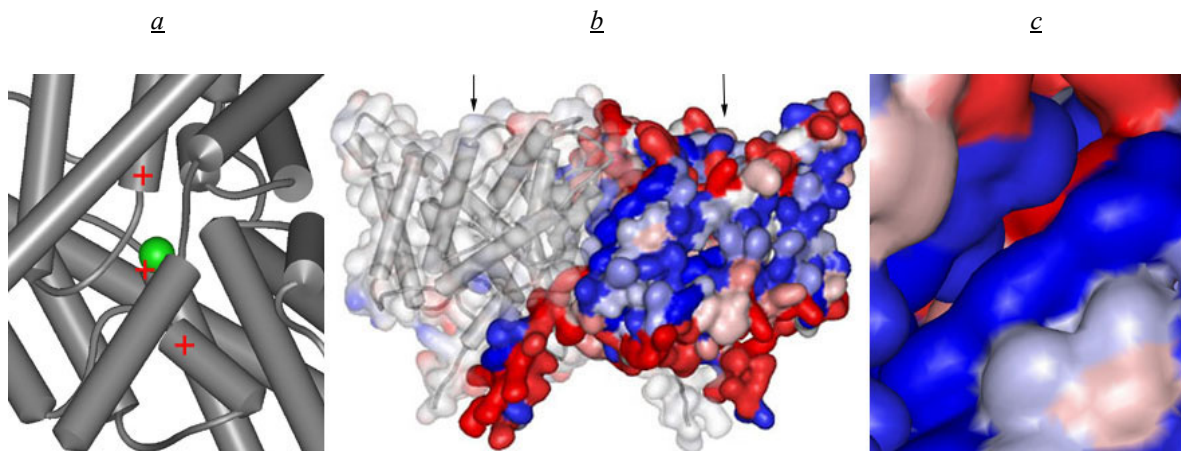
b) Der Homomultimer ist aus neun identischen Untereinheiten aufgebaut (je zwei Helices, rot) und wird vorwiegend durch die eingelagerten verschiedenen Chlorophylle (grau) zusammengehalten. Die einzelnen Untereinheiten sind durch gemeinsame Bindung an die prosthetischen Gruppen, der innere Helixring und zusätzlich durch dichte Packung stabilisiert. Das Photosystem I und II (hier nicht abgebildet) sind im Zentrum positioniert (Tabelle 3).

Unspezifische Kräfte

Verschiedene Triebkräfte, welche für Interaktionen löslicher Domänen verantwortlich sind, können im unpolaren Milieu der Lipiddoppelschicht nicht wirksam werden [83]. In erster Linie ist hier die Abwesenheit des so genannten Hydrophoben Effekts zu nennen [84], also des Entropiegewinns beim Abstreifen geordneter Hydrathüllen von interagierenden Oberflächen. Diese Kräfte spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Sekundärstrukturen von Membranproteinen [85]. Dem „lipophilen Effekt“ wird wiederum nur eine geringe Bedeutung beigemessen, denn die Helixkontakte zur Membran und zu den Nachbarhelices sind beide überwiegend hydrophob.

Unspezifische Kräfte wie das Helix Dipolmoment, spielen für die Faltung nicht die zunächst erwartete Rolle [86]. Helices assoziieren gleichermaßen parallel wie antiparallel, obwohl Kontakte mit in der Sequenz benachbarter Sekundärstrukturen häufig sind [87]. Die Helix Dipole sind vor allem an den Helix Enden wirksam und deshalb vornehmlich außerhalb der Membrangrenzen im wässrig-polaren Milieu positioniert [88]. Eine Ausnahme bilden die Membrankanäle, welche auf Grund ihrer Funktion auch im Innern für Wasser, bzw. Ionen zugänglich sind. Die Helix Dipole sind dann wie beim Kalium- oder Chloridkanal für die Selektivität mitverantwortlich [89] (Abbildung 1, Abbildung 6, Abbildung 15).

Abbildung 6: Helix Dipole bilden einen Teil des Selektivitätsfilters beim Chloridkanal (1kpl, 1kpk)



Der Chloridkanal besteht aus zwei identischen Untereinheiten, mit jeweils einem Chloridkanal. Die Helix Dipole der Enden einiger Helices bilden u. a. den Selektivitätsfilter des Kanals und regulieren seinen Öffnungszustand [64].

a) Selektivitätsfilter mit Chloridanion (1kpl). Die Helix Enden mehrerer Helices sind zum Kanal in Richtung des Chlorid Ions (grün) gerichtet, welches am Eingang des Selektivitätsfilters sitzt. Mit Hilfe der positiven Helix Dipolmomente (+) wird das Chlorid Ion stabilisiert. Umgekehrt ermöglicht das polare Milieu die Positionierung dieser Helix Enden innerhalb der Membrangrenzen.

b) Homodimer des Chloridkanals (Pfeile bezeichnen die Kanaleingänge, 1kpk): Die Proteinoberfläche ist im Kontaktbereich mit der Membran überwiegend hydrophob (blau). Durch die transparente Oberfläche des zweiten Monomers sind die z. T. sehr stark geneigten Helices erkennbar.

c) Dichte Packung zwischen den beiden Monomeren (1kpl). Die komplementären Oberflächen hydrophober Bereiche packen dicht aufeinander; hydrophile Außenflächen (rötlich) liegen in diesem „Patch“ gegenüber.

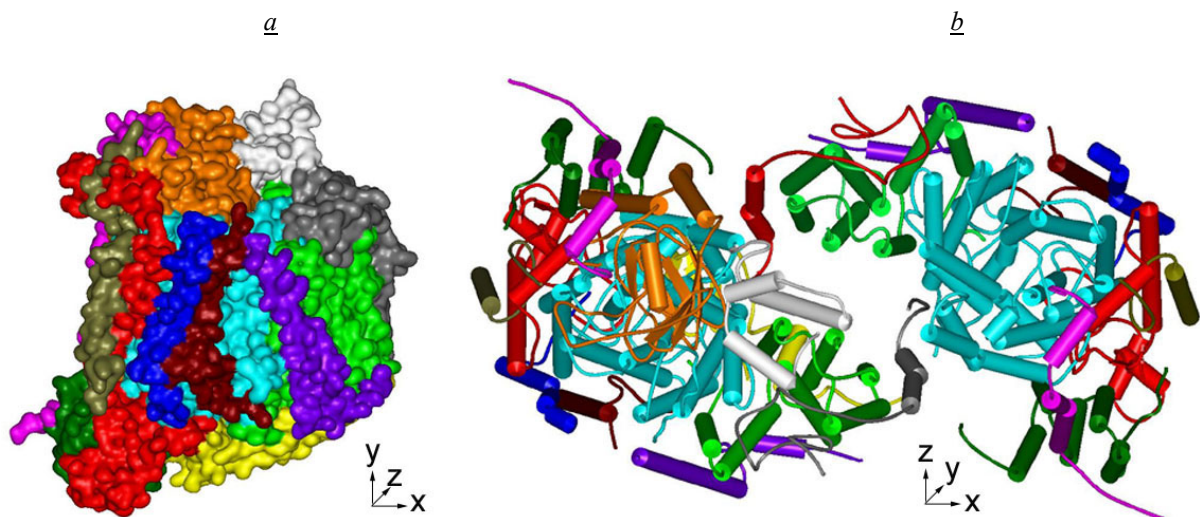
1.3 Biosynthese von Membranproteinen

1.3.1 Das Zwei Phasen Model

Ausgehend von einer Gesamtzahl von rund 24.000 im menschlichen Genom, kodierten Membranproteinen synthetisiert eine durchschnittliche Zelle zu jedem Zeitpunkt viele hundert bis mehrere tausend unterschiedliche Membranproteinuntereinheiten [90]. Wechselwirkungen membranintegrityaler Polypeptidsegmente spielen eine wichtige Rolle bei der Faltung, Oligomerisierung und auch bei der Sortierung vieler integraler Membranproteine [91]. Die einzelnen Untereinheiten polytopischer Membranproteine können sogar unabhängig voneinander an verschiedenen Ribosomen des rauen ER synthetisiert und anschließend in dessen Membran eingebaut werden. Nach posttranslationaler Modifizierung werden sie dort zur Tertiärstruktur gefaltet (Abbildung 9).

Ihre Oligomerisierung geschieht nach zufälliger Kollision der in der Membran flotierenden Polypeptide. Die Ausbildung korrekter Oligomerstrukturen aus diesem gemischten Vorrat an Untereinheiten erfordert daher komplementäre Strukturelemente, welche auf zytosolischen, membranständigen und/oder luminalen bzw. extrazellulären Domänen lokalisiert sein können. Das Auffinden und die Abstraktion solcher Strukturelemente ist deshalb der Kern für das Verstehen dieses Faltungsmodus und eine notwendige Voraussetzung für die Modellierung von Proteinstrukturen [92, 93].

Abbildung 7: Die Untereinheiten der Oxidoreduktase sind unterschiedlichen Ursprungs (1occ)



Die Oxidoreduktase ist mit 204 kD Molekulargewicht das zweitgrößte Membranprotein mit hochaufgelösten Strukturdaten (1occ). Die einzelnen Untereinheiten sind mit unterschiedlichen Farben dargestellt.

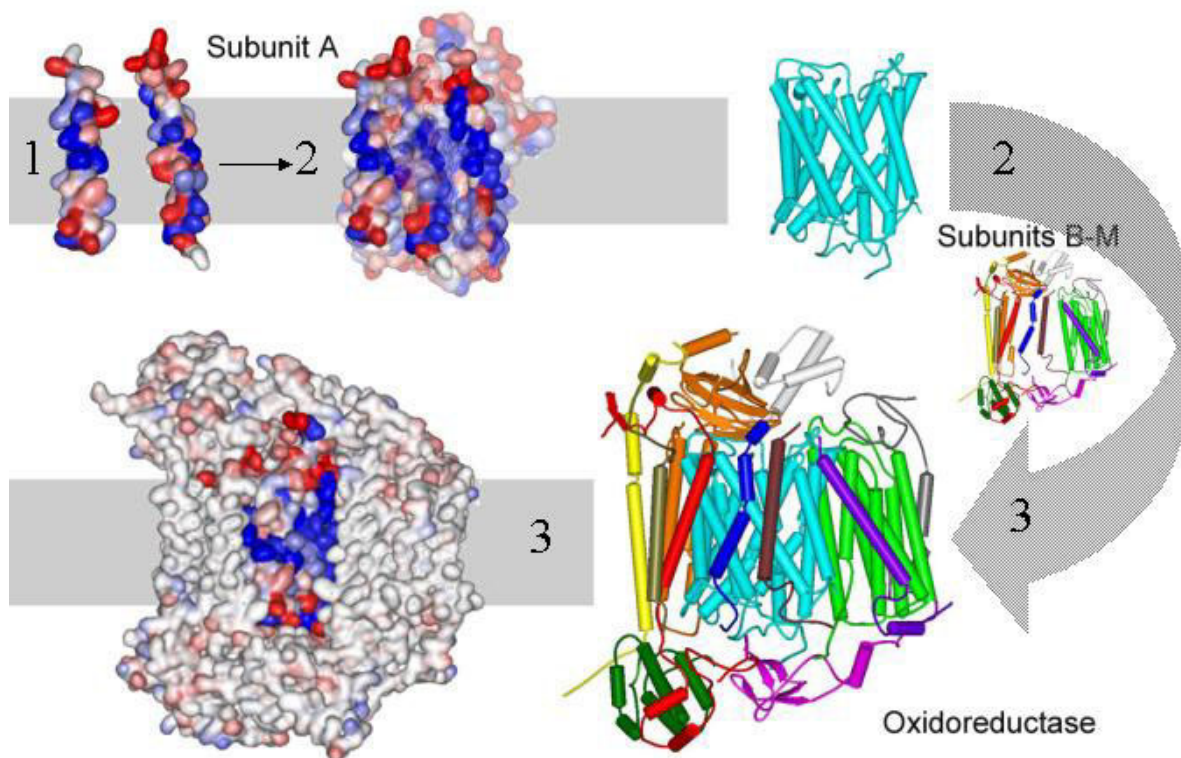
a) Seitenansicht: Die Untereinheit I, II und III (türkis, grün und goldbraun) werden in der Mitochondrien DNA kodiert (die restlichen im Zellkern).

b) Aufsicht Dimer (rechts nur TM-Domänen): In der bakteriellen Oxidoreduktase fehlt die Untereinheit VIa (dunkelgrau), welche in engem Kontakt mit der Untereinheit I den Zusammenhalt der beiden Monomeren bei Eukaryoten garantiert. Die Dimerisierung ist demnach keine Voraussetzung für die Funktionstüchtigkeit dieses Proteins.

Die Assemblierung größerer Membranproteindomänen (100 kD und mehr) kann durch Erweiterung des von [92] aufgestellten Zwei-Phasen Modells beschrieben werden (Abbildung 8). Nach der Einlagerung in die Membran fügen sich die als Sekundärstrukturen vorgefertigten Proteinbestandteile zu Tertiärstruktureinheiten zusammen (Abbildung 8, Schritt 1-2). Danach verbinden sich die einzelnen Untereinheiten zur Quartärstruktur (Schritt 3).

Solche voneinander trennbaren Schritte sind auch aus phylogenetischer Sicht erkennbar: Nur etwa ein Drittel der Oberfläche einer TM-Helix ist später in Kontakt mit der lipophilen Membrenumgebung. Die restlichen stärker konservierten Bereiche liegen im fertig gefalteten Zustand zwischen den Sekundärstrukturen und zwischen Sekundärstruktureinheiten und Liganden. Aminosäurekontakte zwischen Helices innerhalb ein und derselben Untereinheiten sind dabei weniger variabel, als zwischen Helices verschiedener Untereinheiten [94]. Dieser Gradient, dessen Berechnung auf einer Kombination von Struktur- und großer Sequenzdatenmengen beruht, wird folgerichtig von einigen Methoden zur Vorhersage der Tertiärstruktur genutzt (Abbildung 23) [85, 95].

Abbildung 8: Die Assemblierung der Oxidoreduktase („Drei Phasen Modell“, 10cc)



Nach der Einlagerung und Ausrichtung (**Schritt 1**) in der Membran (grau, blaue Proteinoberflächen) fügen sich mehrere Einzel Helices zur Untereinheit A zusammen (**Schritt 2**). Dieser Schritt ist durch in vivo und in vitro Versuche abgesichert: Unabhängig voneinander gefertigte Fragmente (des Bakteriorhodopsin) können zu einem funktionstüchtigen Membranprotein assemblieren [96, 97].

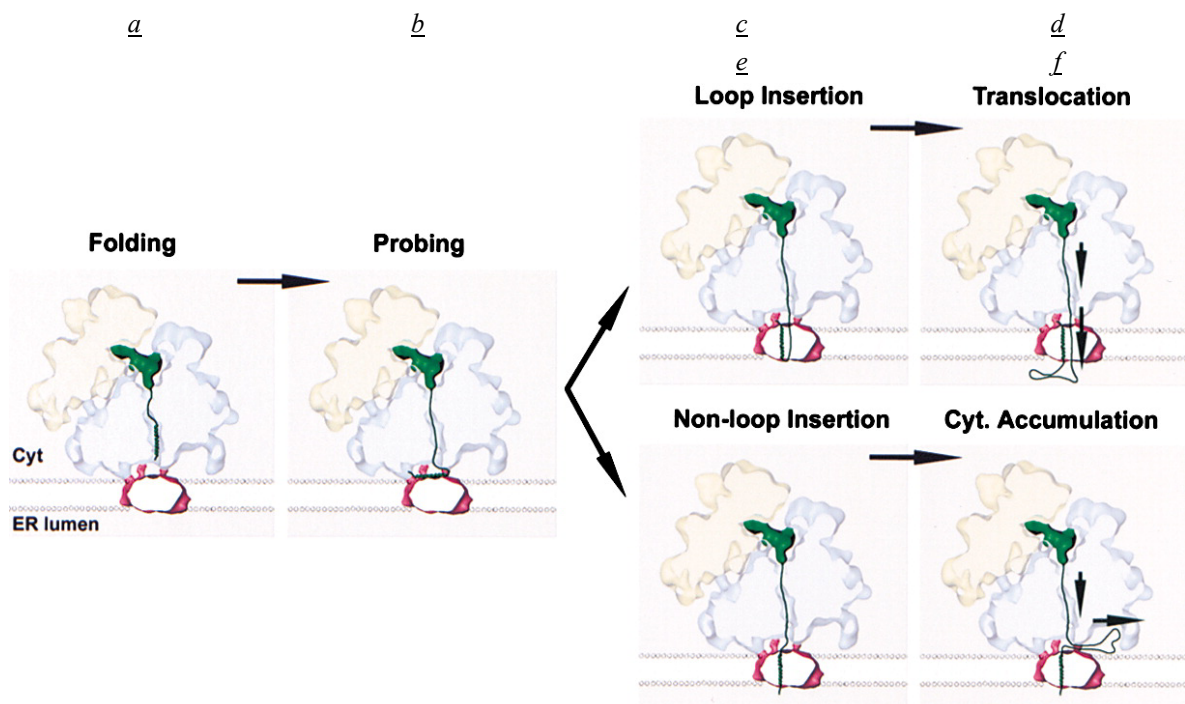
Die Oxidoreduktase (schematisch gezeichnet) bildet in einem **Schritt 3** durch Zusammenlagerung der Untereinheit A mit den restlichen (z. T. im Zellkern kodierten) Untereinheiten das komplette Protein (schematisch und mit nach Elektrostatik - Untereinheit A nach Hydrophobizität - gefärbter Proteinoberfläche).

1.3.2 Der Ribosom-Translokon Komplex

Sämtliche α -helikale Membranproteine (außer diejenigen, welche an Mitochondrien oder Chloroplasten gebunden sind) werden am rauen ER synthetisiert. Das Ribosom lagert sich nach cotranslationaler Erkennung durch den Signalerkennungspartikel, bzw. nach posttranslationaler Erkennung direkt an die ER Membran an und bildet zusammen mit dem Translokon einen kontinuierlichen Kanal (Abbildung 9, Abbildung 10). Der Vorgang der Translokation ist komplex und unterschiedliche Mechanismen werden diskutiert [98, 99, 100].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Ribosom-Translokonkomplexes von Hefe führten jetzt zu dem Binären Modell der Cotranslationalen Protein Translokation [101]. In Abbildung 9 ist der translatierende Zustand (mit geöffnetem Translokon Kanal) beschrieben. Dieses Modell bietet einen Erklärungsansatz, sowohl für die gerichtete Insertion einer Helix in diesen Kanal (a - b), als auch für die Entlassung der cytoplasmatischen Loops ins Cytoplasma (c - d).

Abbildung 9: Der Ribosom- Translokon Komplex von Hefe [101]



Der Ribosom- Translokon Komplex von Hefe während der Translokation einer Polypeptidkette (gelb und bläulich das 40s und das 60s Ribosom; grün die tRNA mit Polypeptid und rot der Sec61).

a) Die Helix entsteht nach diesem Modell bereits im Ribosom Kanal (Beckmann, 2002).

b) Durch die Zusammensetzung der Helix bzw. deren flankierenden Bereichen wird die Orientierung während der Insertion in den Translokon Kanal festgelegt.

c-d) Bei Loop Insertion eines prädestinierten Membranproteins entsteht zuerst ein luminaler Loop, ehe eine weitere Helix durch den Kanal im Ribosom geschleust wird.

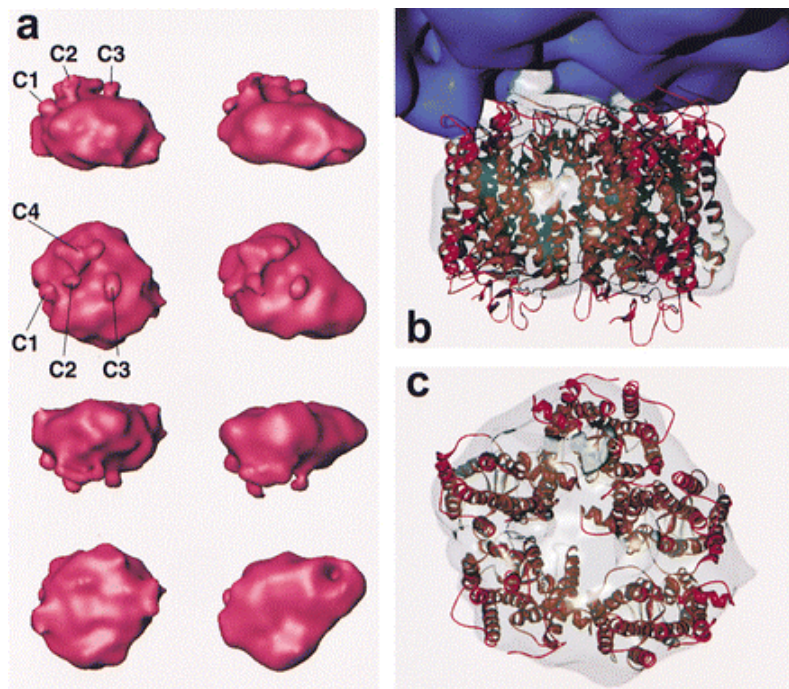
e-f) Bei Nicht- Loop Insertion ermöglicht eine Aussparung zwischen dem 60 s Ribosom und dem Translokon das Austreten der Proteinkette ins Cytosol und damit das Entstehen von cytosolischen Proteinabschnitten.

Als Ergebnis der Translokation werden die hydrophoben TM-Abschnitte in die Membran eingelagert und die Loops im ER Lumen, bzw. im Cytoplasma positioniert. Während der Translokation ermöglicht der Kanal alternierend sowohl eine laterale als auch eine längs-Passage der translatierten Proteinkette [99]. Strukturell ist dieser Vorgang bisher nur wenig verstanden. Wahrscheinlich öffnet sich das Translokon nach der Translation durch das seitliches Auseinanderweichen der Helices (Abbildung 10).

Für den Mechanismus zur Entlassung der z. T. längeren Proteinketten ins Cytoplasma gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Eine vorübergehende Lockerung, bzw. eine Abspaltung des Ribosoms vom Translokon wird dabei nicht ausgeschlossen [99]. Bei Hefe bietet eine Aussparung zwischen dem Ribosom und dem Sec61 einen Erklärungsansatz für die Entstehung solcher Loops. Auch eine Umgehung der Translokation ist möglich: Bakterielle Toxine können z. B. direkt und ohne zu Hilfenahme dieses Komplexes in die ER Membran inserieren [35].

Bei einem Kanaldurchmesser von 60Å könnte die Assemblierung von TM-Domänen mit bis zu fünf Helices auch bereits innerhalb des Kanals erfolgen [102]. Topologische Signale sind über die Länge mehrerer Sekundärstruktur Abschnitte hinweg wirksam, was den Aufenthalt größerer Proteinabschnitte im Translokon voraussetzt [103, 104]. Die häufiger beobachtete Ausbildung von „helikalen Haarklammern“, also zweier mit einem kurzen Loop verbundener helikaler TM-Abschnitte, lässt auf Faltungseinheiten von wenigstens zwei vorgefertigten Sekundärstrukturen schließen [104, 105, 106] (Abbildung 17).

Abbildung 10: Strukturmodell des Sec 61 (Ribosom Komplexes) [101]



a) Die vergleichsweise abgeflachte und verlängerte Form des inaktiven Kanals (linke Spalte, rechte Seite) gibt einen Hinweis auf den durch die Signalsequenz induzierten Öffnungsmechanismus: Die Membran Helices könnten nach Aktivierung durch eine Rotation in eine zur Membranebene eher senkrechte Position gelangen und somit die irisartige Verformung des Kanals bewirken. b) Seitenansicht und c) Aufsicht auf den Sec 61: fünf Rhodopsin Moleküle wurden in diesem Modell nebeneinander positioniert.

1.4 Einfluss der Membran

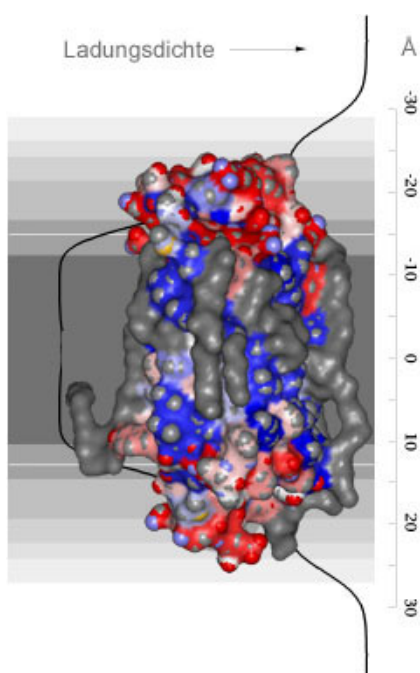
1.4.1 Die Struktur der Membranen

Membranproteine sind in das hydrophobe Milieu der Membranen eingelagert [83]. Die Art (u. a. der Sättigungsgrad) und die Zusammensetzung der Lipide bestimmen den Membrantyp und damit die physikalischen Anforderungen an die eingelagerten Proteine. In der Erythrozyten Membran etwa sitzen Sphingomyelin und Phosphatidylcholin bevorzugt in der äußeren Lage der Doppelschicht, während Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin hauptsächlich in der inneren Lage zu finden sind.

Diese Polarität wird durch die Außen - Orientierung von Glykolipiden und Glykoproteinen noch verstärkt. Die innere Membranoberfläche ist daher negativer, weshalb Loops mit positiv geladenen Aminosäuren bevorzugt auf dieser Seite positioniert werden. Membranproteine werden deshalb in der Regel mit einer festgelegten Innen – Außen Orientierung in die Membranen eingelagert [107] (Abbildung 11).

Charakteristisch für alle natürlichen und auch künstlichen Membranen ist der deutliche Gradient von einem zentralen hydrophoben Bereich von 0-15 Å mit einer niedrigen Dielektrizitätskonstanten ($\epsilon=1-2$) hin zu den flankierenden wasserlöslichen Bereichen von 15-30 Å der polaren Köpfchen ($\sim\epsilon=40$) und dem anschließenden wässrigen Milieu mit einer hohen Dielektrizitätskonstanten ($\epsilon=80$) [11]. Dieser Gradient stellt spezifische Ansprüche an das Protein bezüglich der Besetzung seiner Aminosäurepositionen sowohl während der Faltung, als auch für die Stabilität im fertig gefalteten Zustand (Tabelle 1, Abbildung 15).

Abbildung 11: Die Ladungsdichte entlang der Membrannormalen [83]



Die Verteilung der Ladungsdichte entlang der Membrannormalen graphisch als Linie und als schattierte Fläche dargestellt mit „eingelagertem Bakteriorhodopsin“. Die Ladungsdichte nimmt zum Zentrum der Membran hin ab, weshalb im Innern der Membran hydrophobe Wechselwirkungen vorherrschen. Das Polaritätsprofil wurde mit Hilfe der Kristallstruktur einer Dioleoylphosphocholin Membran (L_{α} -Phase) nach [83] erstellt: Für jede Position wurde dazu die durchschnittliche Ladungsdichte aus der absoluten Dichte der Teilladungen aller quasimolekularen Gruppen ermittelt. Diese errechnet sich aus der Ladung [108] und dem eingenommenen Volumen jeder Gruppe [109]. Das Bakteriorhodopsin (1c3w) wurde in dieses Ladungsprofil entsprechend der Polarität der Proteinoberfläche (Farben wie in Abbildung 4) und der assoziierten Lipide gelegt (Abbildung 30).

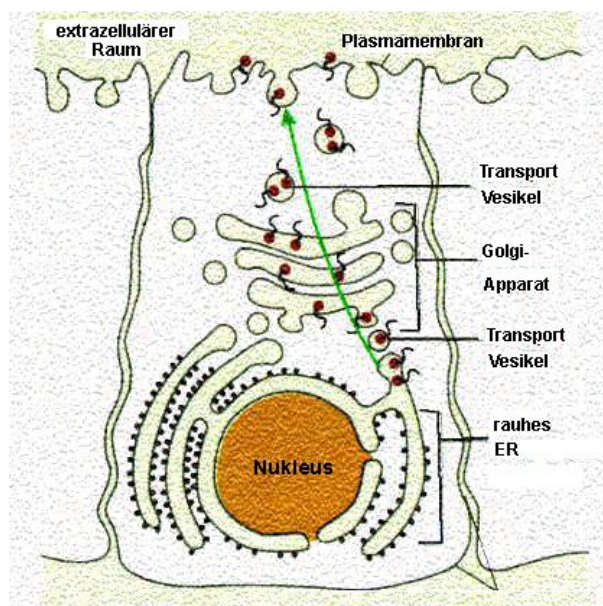
Die Dicke der Membran variiert proportional mit der Kettenlänge der beteiligten Fettsäurereste [110]. Generell wird die Fluidität der Membranen in *Prokaryoten* durch Variation der Länge und der Doppelbindungszahl der Fettsäureketten reguliert. Bei Tieren wird durch die dazu äquimolaren Bestandteile Cholesterol und Sphingolipide außerdem der Durchmesser, die Viskosität und die Permeabilität insbesondere der Plasmamembran und des Endosoms geregelt [111, 112, 113].

Lokal können diese Bestandteile auch in höheren Konzentrationen in Mikrodomänen auftreten. Sie dienen dann der Sortierung bzw. der lokalen Anreicherung von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten in bestimmten Membranregionen [114, 115]. Die Membranen bilden derart nicht nur das notwendige Milieu für die Synthese von Membranproteinen, sondern bestimmen auch die Stabilität und Funktionstüchtigkeit dieser Strukturen im fertig gefalteten Zustand.

1.4.2 Die Sortierung von Membranproteinen im Golgi Apparat

Mikrodomänen der Membran stellen ein selektives Transportmittel für GPI-Anker Proteine und Membranproteine wie z. B. Haemagglutinin, vom Golgi Apparat zum apikalen Zellpol dar (Abbildung 12). Die Sekretion dieser Proteine verläuft u. a. wahrscheinlich über einen Gradienten hin zu Cholesterol reicheren Kompartimenten des Golgi Apparates, in denen der Membrandurchmesser und die Länge der hydrophoben Membranabschnitte dann mit etwa 30 Å gut übereinstimmen [114, 115, 116]. Diese Übereinstimmung ist auch wichtig für die Stabilität und Funktionstüchtigkeit des Proteins.

Abbildung 12: Der direktionale Transport von Membranproteinen im Golgi Apparat [115]



Am rauen ER gebildete Membranproteine (schwarz und rot bezeichnen den cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteinanteil) werden über Transport Vesikel und den Golgi Apparat zur Plasmamembran transportiert. Die luminalen Abschnitte landen später im Extrazellulären Raum. Die Abschnitte, in denen sich die Transportvesikel abschnüren (Mikrodomänen) besitzen zudem dickere Membranen. Auf diese Art und Weise ist ein direktionaler Transport von Plasmamembranproteinen möglich: Golgi Apparat spezifische Membranproteine mit kürzeren TM-Abschnitten wandern nicht in diese Mikrodomänen.

Golgi Apparat spezifische Membranproteine sind daher besser an die dünneren und weniger kompakten cholesterolarmen Lipiddoppelschichten angepasst. Die im Golgi Apparat verbleibenden Membranproteine besitzen im Durchschnitt um 7,5 Å kürzere Membranabschnitte mit einem deutlich höheren Anteil an Aminosäuren mit sperrigen Seitenketten (z. B. 13,7 % Phe, vgl. mit 5,3 % in der Plasmamembran) [114].

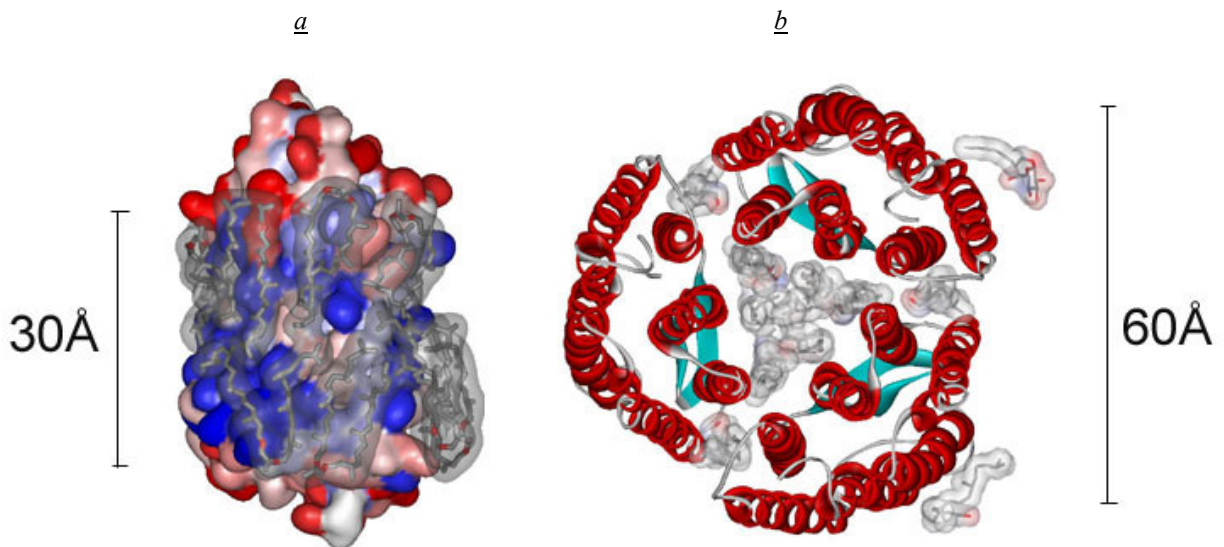
Zur Einlagerung in die ER Membran und für die anschließenden Faltungsschritte hingegen benötigen alle neu synthetisierten Membranproteine eine deformierbare und deshalb cholesterolarme Umgebung. Wie alle Biomembranen befindet sich deshalb auch die ER Membran in der für die Zellfunktionen wichtigen (gel-) flüssigen, nicht kristallinen L_α - Phase [83].

1.4.3 Was passiert bei einem „Hydrophobic Mismatch“?

1.4.3.1 Anpassung der Membran an das Protein

Das Verhältnis zwischen der Länge und dem Durchmesser des hydrophoben Membranproteinabschnittes und der Membran regelt neben der Sortierung und dem directionalen Transport auch die Aktivität des eingelagerten Proteins [117]. Proteine überwiegen die Lipid-Bestandteile in den unterschiedlichen Membranen um das 1,4 bis 4-fache an Masse. In Abhängigkeit ihrer Konzentration und ihrer Aggregation beeinflussen die eingelagerten Proteine mehr oder weniger deutlich die Zusammensetzung und damit die physikalischen Parameter wie Durchmesser oder Viskosität ihrer lipophilen Umgebung [118] (Tabelle 1, Abbildung 13).

Abbildung 13: Protein- Lipidkomplex beim Bakteriorhodopsin (1qhj)



a) Seitenansicht (1qhj): Die Länge der Lipiddoppelschicht (grau durchscheinende Oberfläche) ist an die Länge des hydrophoben Membranabschnitts (blau) angepasst. Durch Streckung bzw. Stauchung von Lipiden ist zusätzlich eine lokale Anpassung an längere bzw. kürzere hydrophobe Proteinabschnitte möglich.

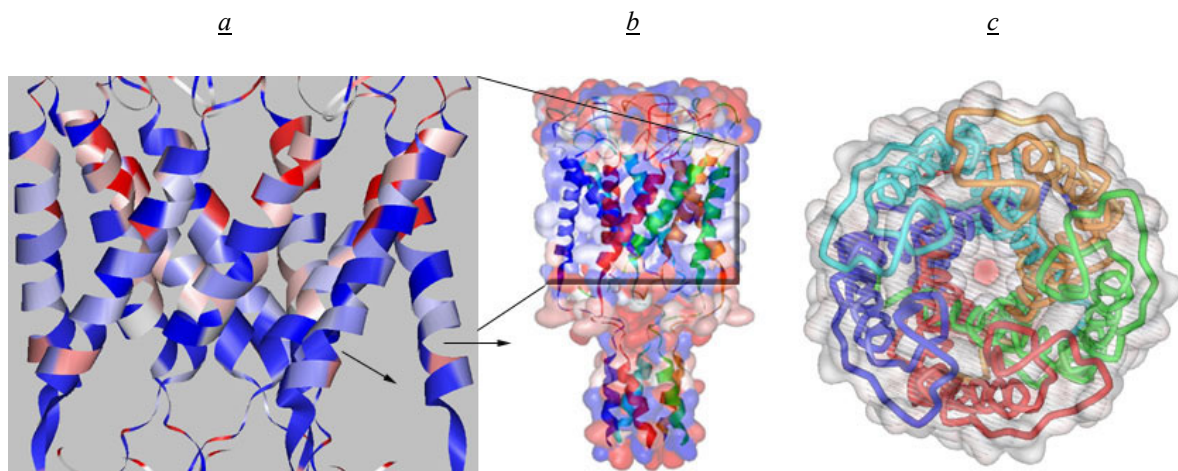
b) Aufsicht auf 1brr: Auch zwischen den Trimeren (Helices rot, Faltblätter türkis) liegen beim Bakteriorhodopsin Lipide (Massenverhältnis: 4/1), so dass in der natürlichen Membranumgebung praktisch keine Protein-Proteinkontakte zwischen den Monomeren existieren.

Die Lipide einer Membran aus Phosphatidylcholinen können in direkter Nachbarschaft von einem Membranprotein über die Kohärenz Länge ξ von etwa 1,2 nm gestreckt oder gestaucht werden [119, 120]. Die Zunahme der Dicke synthetischer Membranen ist auf einen maximalen Betrag von 0,4 nm beschränkt [121]. Die Abnahme ist hingegen bis zu einem Nanometer Dicke möglich.

Zusätzlich lagern sich aus einem größeren Pool unterschiedlicher Lipide bevorzugt diejenigen an das Protein an, welche auf Grund ihrer Länge bereits gut mit dem hydrophoben Durchmesser des Membranabschnittes des Proteins übereinstimmen. Membranproteine sind daher ebenfalls an der Entstehung und Ausgestaltung von Mikrodomänen beteiligt [122].

Der Einfluss des eingelagerten Proteins auf die Membrandicke nimmt allerdings mit wachsender Entfernung rasch ab: Bakteriorhodopsin verändert den Durchmesser einer Membran aus Phosphatidylcholinen nicht über eine Distanz von 4,5 nm, was etwa 6-7 Lipidlagen entspricht [119]. Umgekehrt wird ein „ungünstiges“ Längenverhältnis durch Anpassung der Neigungswinkel von TM-Helices ausgeglichen [112, 123]. Dies kann wie experimentell im Falle der ATPase nachgewiesen zu einer Deaktivierung oder wie für den mechanosensitiven Rezeptor postuliert, zu einer Aktivierung der Enzymfunktion führen [60, 124]:

Abbildung 14: Öffnungsmechanismus beim mechanosensitiven Ionenkanal (1msl)



Der geschlossene mechanosensitive Ionenkanal von *Mycobacterium tuberculosis* (1msl). Diese Kanalproteine reagieren spezifisch auf Veränderungen der Membrandicke, z. B. bei Zu- bzw. Abnahme des Zellvolumens [60]. Die Proteinoberfläche in (b) und die einzelnen Helices in (a) sind nach der Hydrophobizität (blau) der beteiligten Aminosäuren gefärbt.

a) Detailansicht des Membranabschnitts: Der Ionenkanal öffnet sich wahrscheinlich durch Scheerbewegungen benachbarter Helices (Pfeile). Die Kontakte innerhalb der Monomere bleiben dabei vermutlich unverändert [66]. Der Kanaleingang ist durch hydrophile Aminosäuren gesäumt (rot gekennzeichnet).

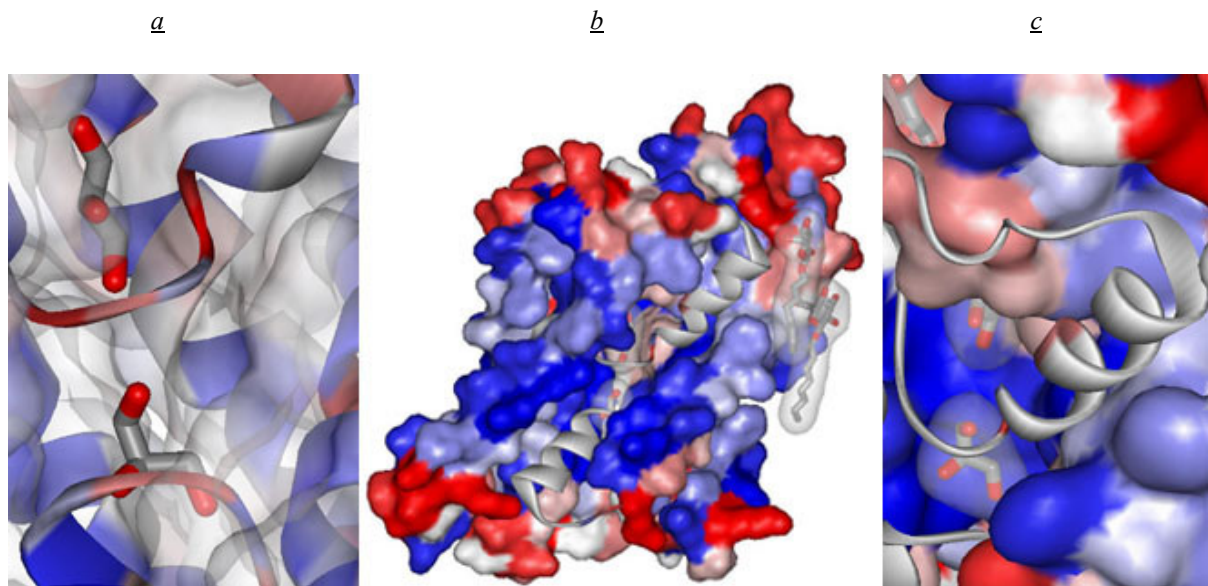
b) Seitenansicht und **(c)** Aufsicht: Wie alle bisher bekannten Ionenkanäle ist die funktionelle Einheit aus mehreren gleichen Proteinuntereinheiten aufgebaut (verschiedenen Farben).

1.4.3.2 *Anpassung des Proteins an die Membran*

Im Extremfall werden zu kurze TM-Abschnitte gar nicht erst in die Membran eingelagert. Erst ab einer bestimmten Länge des hydrophoben Abschnittes können TM-Helices assoziieren und funktionstüchtige Proteine ausbilden. Für TM-Abschnitte von Proteinen der Plasmamembran wird ein Durchmesser von mindestens 15 Aminosäuren, oder 23 Å angegeben [125]. Längere hydrophobe Abschnitte ($\varnothing_{\text{insg}} = 18,3$ Reste) bewirken dann eine zunehmende Neigung der eingelagerten Sekundärstrukturen relativ zur Membrannormalen (Abbildung 41). Dieser Winkel passt einerseits den hydrophoben Proteinabschnitt an die Länge der Fettsäurereste der Lipiddoppelschicht an. Andererseits werden auf diese Art und Weise komplementäre Sekundärstrukturen auf Passfähigkeit ausgerichtet und die Assoziation zur Tertiärstruktur vorangetrieben [125].

Ein günstiges Verhältnis zwischen Membrandicke und der Länge des hydrophoben TM-Abschnitts ist deshalb eine notwendige Voraussetzung zur Einlagerung und für die Funktionalität des Proteins. Der Wirkungsort eines Membranproteins zeichnet sich letztendlich immer durch eine vorteilhafte Korrelation der oben genannten Parameter aus [126]. Kanäle bilden in dieser Hinsicht gewissermaßen eine Ausnahme, da bei diesen Proteinen auch innerhalb der Membrangrenzen eine größere Kontaktfläche zum Wasser besteht (Abbildung 15). Einige der daraus resultierenden strukturellen Besonderheiten sind in Abbildung 6 und Abbildung 14 beschrieben.

Abbildung 15: Helixdipole im Kanal des Aquaporin von E. coli. (1fx8)



b) Seitenansicht: Die Proteinoberfläche ist nach der Hydrophobizität der beteiligten Aminosäuren eingefärbt (blau ist hydrophob, rot hydrophil) und lässt einen Blick auf Helix 3 und 6 frei. **a)** Die Loops der beiden Helices ragen in den Kanal und bilden den Selektivitätsfilter für Glycerol (Moleküle in Stäbchenform). Neben hydrophilen Aminosäuren (rote Loop Bereiche) sind auch die Helix Dipole an der spezifischen Erkennung von Glycerol beteiligt. **c)** Das Ende von Helix 3 und 5 und der anschließende Loop enden im Kanal (Kanaleingang mit Glycerol links oben).

1.5 Vorhersage von Membranproteinen

1.5.1 Vorhersage der Sekundärstruktur

1.5.1.1 Vorhersage alpha-helikaler TM-Abschnitte

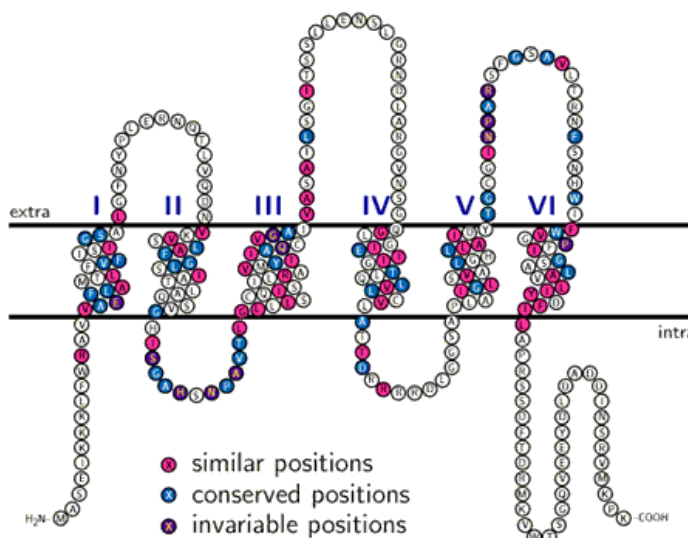
Grundlage

Die rechnergestützte Erkennung helikaler Membranabschnitte an Hand der Aminosäuresequenz gilt als allgemein nützliches Tool in der Bioinformatik. Den Vorhersageprogrammen (<http://www.sacs.ucsf.edu/Links/transmem.html>) liegen dabei Algorithmen zu Grunde, welche die Eigenschaften [127] und Nachbarschaften von Aminosäuren mit Hilfe von neuronalen Netzen [128], dynamischer Programmierung, bzw. Hidden-Markow Modellen bewerten [129].

Zur Verbesserung der Vorhersagekraft wurden in einige dieser Methoden zusätzlich multiple Alignment Scores eingearbeitet [128, 130]. Die Kontaktflächen zwischen Helices sind besonders konserviert und lassen sich deshalb häufig von den ebenfalls hydrophoben Kontaktflächen zwischen den TM-Helices und der Membran unterscheiden [95].

Bei membranintegralen Proteinuntereinheiten ist die Abfolge zytosolischer und luminaler bzw. extrazellulärer Loops an ein festes Schema gebunden (Abbildung 16). Auf jeden Loop folgt ein hydrophober helikaler Membranabschnitt. Aus dieser Vereinfachung resultiert die recht gute Vorhersagequalität vieler Programme. Die exakte Position der Membrangrenzen kann dadurch aber in der Regel nicht ermittelt werden [131].

Abbildung 16: Die Topologie von Membranproteinen [132]



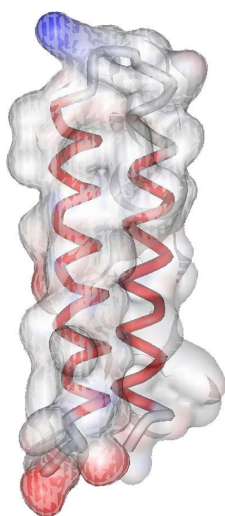
Zweidimensionale Darstellung eines vorhergesagten Membranproteins mit 6 TM-Helices mit Hilfe von TEXTopo [132]. Die Abfolge der Helix Loops ist auf Grund der Bindung an die Membran festgelegt. Ähnliche konservierte, bzw. invariable Aminosäurepositionen können mit Hilfe multipler Alignments [133] bestimmt werden und sind hilfreich für die Erkennung der Helix- Helix Kontaktflächen und der Membrangrenzen (Abbildung 23, Abbildung 40).

Gute Fettlöslichkeit der TM-Segmente ist ein weiteres grundlegendes Kriterium der Sekundärstrukturvorhersage. Es genügt aber nicht, um membranintegrale Sekundärstrukturelemente mit ausreichender Sicherheit zu erkennen und von denen wasserlöslicher globulärer Proteine zu unterscheiden [131] [134]. Anzahl, Länge und die Position innerhalb der Sequenz fließen daher ebenfalls in die Bewertung mit ein. [95] unterteilt die möglichen α -helikalen TM-Abschnitte zusätzlich in zentrale und flankierende Bereiche für die er unterschiedliche Aminosäure Propensities angibt.

Der Übergangsbereich vom hydrophoben zum polaren Membranmilieu ist aber bisher nicht detailliert untersucht worden [135], obwohl das Auffinden spezifischer Aminosäurebesetzungen die Sekundärstrukturvorhersage entscheidend verbessern könnte [136]. Im ersten Kapitel des Ergebnisteils werden die Unterschiede zwischen der Besetzung der Helix Endpositionen in Abhängigkeit von dem Umgebungsmilieu untersucht (Tabelle 6). Das Auffinden bestimmter Aminosäuremuster, welche die exakte Positionierung des Helixcaps in dem Interfacebereich zwischen hydrophilen und hydrophoben Milieu garantieren, könnte einen wichtigen Schritt in diese Richtung darstellen.

Das entscheidende Kriterium aller Vorhersageprogramme, sowohl zur Identifizierung der α -helikalen TM-Abschnitte, als auch zur Diskriminierung der Topologie ist deshalb, bisher die Aminosäurezusammensetzung der Loop- Regionen, welche die überwiegend hydrophoben Sekundärstrukturelemente sequentiell miteinander verbinden: Im Cytoplasma finden sich vornehmlich positiv geladene Aminosäuren wie Arg und Lys (Abbildung 17), während die im Periplasma befindlichen Loops keine Häufung von Aminosäuren bestimmter Ladung zeigen [137]. Grund für die davon abgeleitete Hypothese der "positive- inside rule", ist z. B. der höhere Gehalt an negativ geladenen Lipidköpfchen auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran [138].

Abbildung 17: Ein "helical hairpin" mit unterschiedlich geladenen Loops (1c3w)



Helix 4 und 5 von Bakteriorhodopsin (1c3w) als Beispiel einer „helikalen Haarlammer“. Die Oberfläche der Helices ist transparent gezeichnet. Besonders auffällig ist die Ladungstrennung zwischen den cytoplasmatischen (blau, positiv) und extrazellulären Loops (rot, negativ):

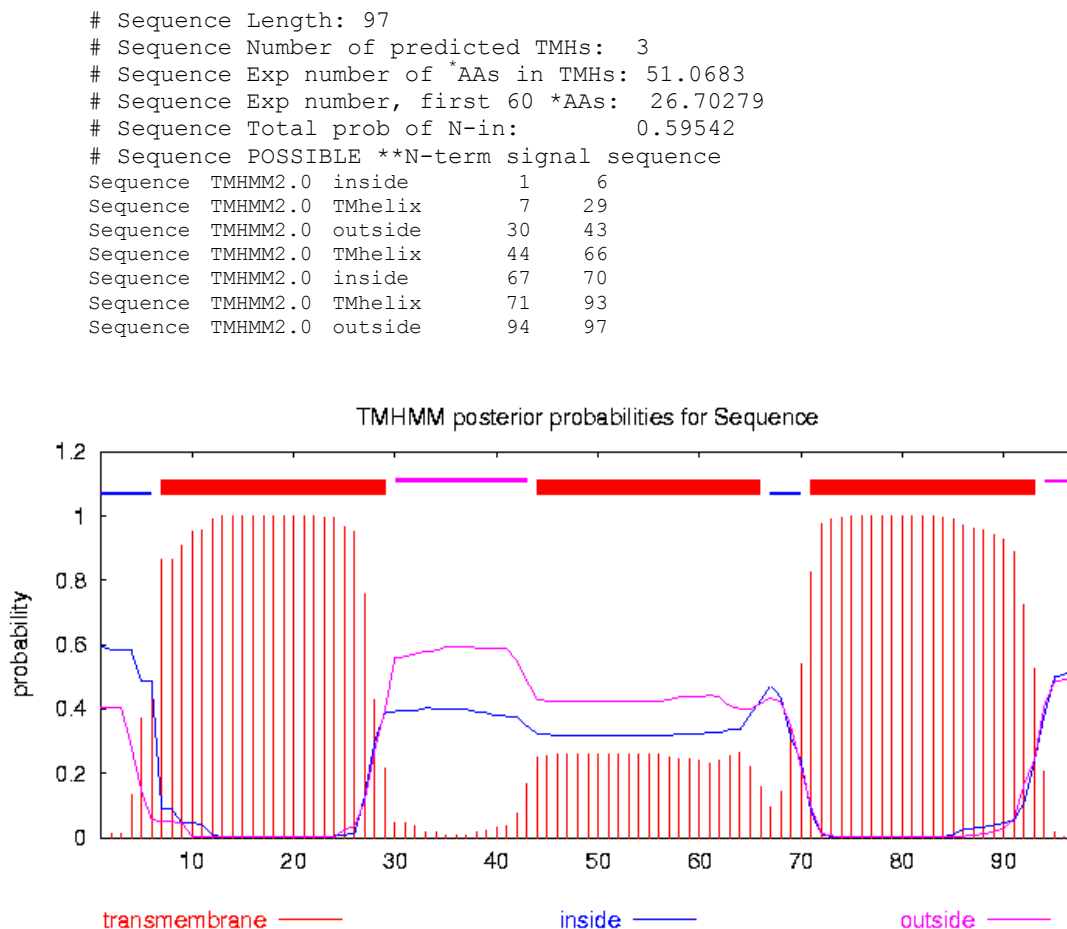
Die Zusammensetzung der Loops dient nämlich als topologisches Signal für die Innen- Außen Orientierung des Membranproteins. Eine höhere Konzentration positiv geladener Aminosäuren kann die Passage durch das Translokon verhindern, was zur Anreicherung von positiven Ladungen in den cytoplasmatischen Loops führt [137]. Auf diese Art und Weise werden Proteine entsprechend der Ladungsasymmetrie der Membran in diese eingelagert.

Qualität der Topologievorhersage von Membranproteinen

Die Sensitivität zur Auffindung von α -helikalen Membranabschnitten liegt für die meisten Vorhersageprogramme bei über 80 % [134]. Der Anteil korrekt vorhergesagter Membranabschnitte (exakte Anzahl, keine falsch positiven oder falsch negativen) liegt für einen Testsatzen von 87 Proteinen welche in keiner der Lernmengen enthalten sind bei 50-60 % für die besten Programme TMHMM [139] und MEMSAT 1.5 [95]. Für etwas mehr als die Hälfte davon wurde auch die richtige Innen-Außen Orientierung gefunden.

Die am effektivsten arbeitenden Programme können demnach für knapp ein Drittel der eingelesenen Sequenzen die tatsächlich richtige Topologie aller Helices vorhersagen [134]. Eine bessere Absicherung der Ergebnisse erzielt man schließlich nach Konsensus Vorhersage, durch Anwendung mehrerer Programme z. B. durch Verwendung eines Metaservers [140, 141], (http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/submit_meta.html).

Abbildung 18: Ergebnissausgabe des Vorhersageprogramms THMHH [139].



Ergebnis des auf einem Hidden Markov Modell basierten Vorhersageprogramms THMHH [139]. Die Eingabesequenz ist die des Kaliumkanals von *Streptomyces lividans*. Neben den helikalen TM-Abschnitten (auch die amphipatische Kanal Helix wird erkannt) wird auch die Topologie (mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit) richtig vorhergesagt. Bei der eingegebenen Sequenz könnte es sich alternativ möglicherweise auch um ein N-terminales Signalpeptid handeln (*Aas: Aminosäuren, **N-term: N-Terminus).

Die rechnerbasierte Bestimmung des Anteils von Membranproteinen an den verschiedenen Genomen liegt mit guter Übereinstimmung bei Werten von 20-30 % [95, 139]. Die N_{in} - C_{in} Topologie und die 12 TM-Proteine sind demzufolge etwa 1,5-3-mal stärker in den bakteriellen Genomen vertreten als jede der anderen Varianten.

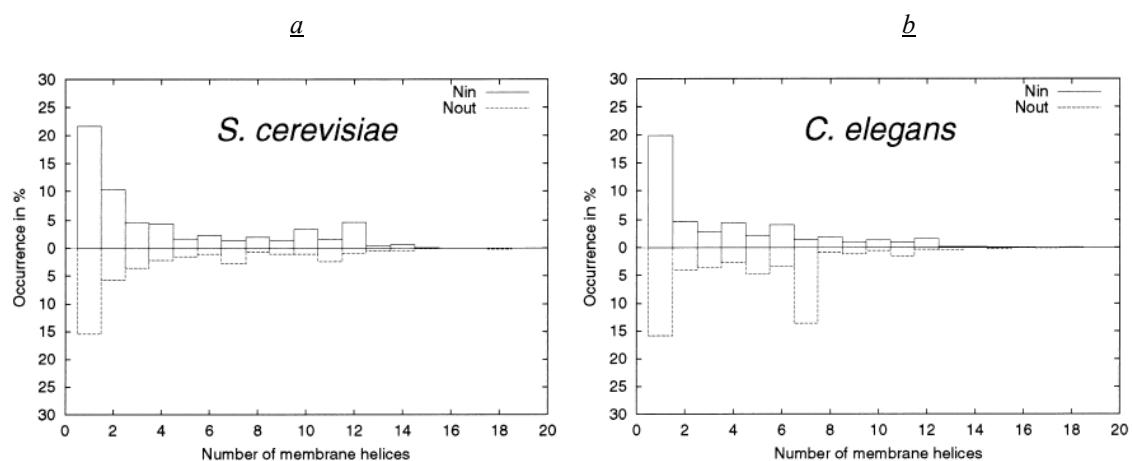
Mehrzeller (*C. elegans*, *homo sapiens*) besitzen auf Grund der dominanten Strukturfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren einen deutlichen Anteil von 7 TM-Proteinen und deshalb ein ausgeglichenes Verhältnis der N_{in} - C_{in} und der N_{out} - C_{in} Topologie [139, 142]. Der Vorzug der N_{in} - C_{in} Topologie wird gemeinhin als Verweis auf einen bevorzugten Faltungsweg betrachten, der eine gerade Anzahl an TM-Helices voraussetzt (Abbildung 17) [104, 106, 143].

Selektivität und Sensitivität

Membranproteine mit einem einzelnen α -helikalen Membranabschnitt (bitopisch) [90], unterscheiden sich bezüglich der Aminosäurezusammensetzung und deren Mutabilität von der mit mehreren solchen Abschnitten [144, 145]. Bei dieser Strukturgruppe liegt der Anteil hydrophober Aminosäuren bei insgesamt 68 %. Dieser im Vergleich zu polytopischen Membranproteinen um 13 % höhere Anteil führt häufig zur Verwechslung mit β -Faltblättern wasserlöslicher Proteine.

Gleichermaßen problematisch ist die Erkennung von α -Helices, die in größere Proteinkomplexe (z. B. Atmungssysteme) eingeschlossen sind [134]. Die strukturellen Anforderungen an solche Membranabschnitte werden wahrscheinlich eher durch die Proteinumgebung als durch die Membran geprägt und werden von vielen Vorhersagealgorithmen nicht erfasst.

Abbildung 19: Topologie bei *S. cerevisiae* und *C. elegans* [139]



a) Bei *S. cerevisiae* ist der Anteil von N_{in} - C_{in} verhältnismäßig höher, als der N_{out} - C_{in} Topologie.

b) Die 12 Helix Bündel Membranproteine sind bei Bakterien, die 7- Helix Bündel Membranproteine bei Mehrzellern bevorzugt. Dies führt bei *C. elegans* sehr wahrscheinlich auch zu der Bevorzugung der N_{out} - C_{in} Topologie.

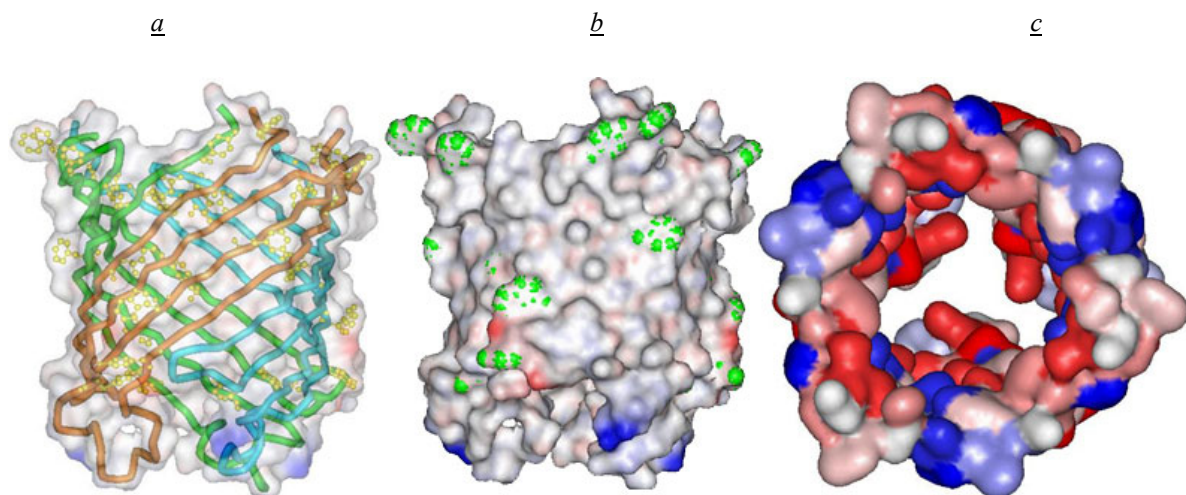
1.5.1.2 Sekundärstrukturvorhersage von Beta-Barrel Membranproteinen

Zur Vorhersage von β - bzw. möglichen α - β -Strukturen existieren eine Reihe von Programmen, die als Grundlage die typischen Merkmale von bekannten β -Fass Strukturen verwenden [33, 146]. Ein wesentliche Bauprinzip der β -Fässer ist die β -Haarklammer: Zwei durchschnittlich 10 ± 1 Aminosäure lange TM-Abschnitte sind durch einen kurzen Loop < 5 Aminosäuren verbunden (Abbildung 3).

Längere Loops sind ausschließlich auf der periplasmatischen Seite der Membran zu finden und somit auch ein gutes Kriterium zur Festlegung der Topologie. Die im Vergleich zu α -helikalen Membranproteinen kürzeren TM-Abschnitte ermöglichen außerdem die Differenzierung dieser beiden Architekturtypen. β -Fässer lassen sich von β -Faltblättern wasserlöslicher Proteine auf Grund der im Durchschnitt kürzeren Loops unterscheiden [34]. Der Mäander antiparalleler β -Faltblätter durch die Membran ergibt überdies insgesamt immer eine gerade Zahl.

Hydrophobe und aromatische Aminosäuren sind außerdem in den TM-Abschnitten, bzw. deren Begrenzungen konzentriert und ein weiteres Differenzierungsmerkmal. Tyr, bzw. Trp z. B. sind doppelt sooft bzw. 6 mal häufiger in dem Übergangsbereich zu finden, als im hydrophoben Kernbereich der Membran, während Leu und Ala dort in etwa doppelt so häufig 6-mal [147]. Der in der Einleitung beschriebene Zweierhythmus hydrophober und hydrophiler Aminosäuren ist aber bei vielen β -Fässern nicht zwingend und auf Grund der Ähnlichkeit zu vielen wasserlöslichen β -Faltblättern kein zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal.

Abbildung 20: Homologiemodell eines Prion β - barrel Kanalproteins



Die Aminosäuresequenz des menschlichen Prionproteins kann so in das β - Barrel (Template: Phospholipase (OMPLA), IqD5) gefädelt werden, dass die Aromaten (a) gelb, (b) grün sich im Bereich der Membrangrenzen häufen.

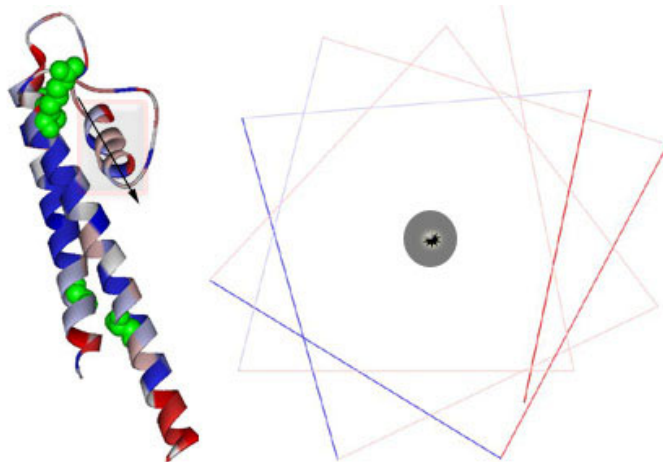
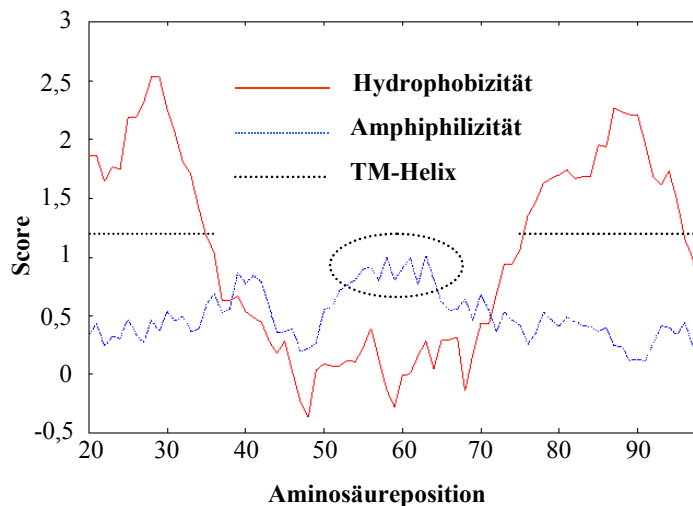
c) Die hydrophilen Aminosäuren (rot) weisen in das Innere des Barrels, die hydrophoben sind in diesem Modell vorwiegend an der Oberfläche (Membrankontaktflächen) zu finden.

1.5.1.3 Sekundärstrukturvorhersage von Kanalproteinen und Transportern

Die sichere Identifikation von Membrankanälen und Transportproteinen beruht vorwiegend auf der Interpretation biochemischer Daten bzw. auf deren Einordnung in gut charakterisierte und funktionsbasierte phylogenetische Systeme [148, 149]. Mit Hilfe der PROSITE Datenbank [150] kann eine derartige Zuordnung wie z. B. zu der Familie der Aquaporine selbst bei geringer Sequenzidentität (< 20 %) erfolgen [151].

Integrale Membranproteine bilden entsprechend der jeweiligen Proteinfunktion neben lateralen Kontakten zu den Fettsäureresten der Lipiddoppelschicht auch größere Kontaktflächen zum wässrigen Milieu [89]. Hydrophobizitätsplots ermöglichen daher in einigen Fällen das Erkennen der entlang des Proteinkanals positionierten hydrophilen Reste [152, 153, 154].

Abbildung 21: Analyse der Primärstruktur der Kaliumkanals (1k4c) mit WHAT [155].



a) Analyse der Primärstruktur der Kaliumkanals (1k4c) mit Hilfe von WHAT [155]. Die Sekundärstruktur und Topologie wird dabei mit Hilfe von MEMSAT und JPred [95, 140] bestimmt: Die Positionen der beiden TM-Helices überschneiden sich mit den Bereichen großer Hydrophobizität. Die Kanalhelix ist als Bereich größerer Amphiphilizität von Aminosäureposition 55-65 als Kreis umrandet erkennbar.

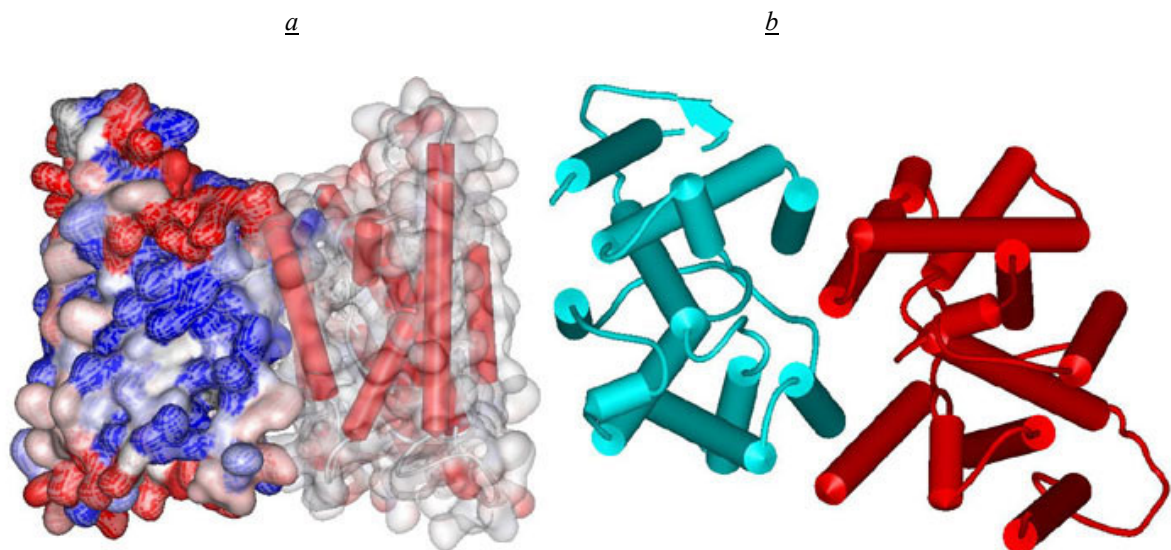
b) links: Monomer des Kaliumkanals (1k4c) nach Hydrophobizität eingefärbt. Die vorhergesagten C- und N-Termini sind grün gekennzeichnet.

rechts: Kanalhelix (Aufsicht auf Pfeilspitze) ist amphipatisch: Die hydrophoben (blau) und hydrophilen (rot) Reste sind auf den gegenüberliegenden Seiten der Helix positioniert und kennzeichnen die Membran, bzw. den Kanalverlauf.

Die wichtigsten Tools zur Sekundärstrukturanalyse potentieller bzw. bekannter Kanalproteine und Transporter sind auf der Homepage von M. H. Saier (<http://www-biology.ucsd.edu/~msaier/transport>) zu finden. WHAT hat zusätzlich zur Hydrophobizitäts- und Amphiphilizitätsanalyse die Sekundärstrukturvorhersageprogramme JPred und MEMSAT integriert [155] (Abbildung 21). Die Bestimmung des Sekundärstrukturtypus der amphiphilen Bereiche ist allerdings nicht automatisiert und eine Interpretation vielfach schwierig.

Die kurzen α -helikalen Abschnitte des Kaliumkanals und der Aquaporine wurden z. B. fälschlicherweise als β -Faltblätter vorhergesagt [151, 156]. Nur ein Teil der insgesamt 20 bzw. 18 TM-Helices der jüngst aufgeklärten Strukturen des ABC-Transporters bzw. des Chloridkanals können mit den derzeitig verfügbaren Tools erkannt werden [64, 157] (Abbildung 22). Die Zunahme an verfügbaren Strukturinformationen lässt allerdings ebenso eine Verbesserung der Sekundärstrukturvorhersage von Kanalproteinen und Transportern erwarten.

Abbildung 22: TM-Abschnitt eines ABC-Transportproteins (117v)



Membranspannende Transportuntereinheiten des BtuCD von *E. coli*, ein ABC-Transportprotein zur Aufnahme von Vitamin B₁₂ (117v) [157].

a) Seitenansicht: Die Oberfläche des C Monomers ist nach hydrophoben und hydrophilen Resten blau, bzw. rot eingefärbt. Die Oberfläche des identischen D Monomers ist transparent und ermöglicht so die Ansicht der unterschiedlich langen und verschieden geneigten TM-Helices.

b) Aufsicht: Der wassergefüllte Transportkanal verläuft zwischen den beiden unterschiedlich gefärbten Monomeren. Unter Verbrauch von ATP werden diese beiden Untereinheiten, vermutlich durch Zusammenklappen der beiden cytoplasmatischen D Untereinheiten (nicht eingezeichnet) nach Anlagerung des Vitamins B₁₂ scharnierartig zum Zellinnern hin geöffnet. Die TM-Domäne dieses ABC-Transporters ist aus insgesamt 20 TM-Helices aufgebaut. Auf Grund der geringen Sequenzähnlichkeiten innerhalb dieser Familie und der schwierigen Vorhersage von Transportproteinen i. A. galten bisher 12 TM-Helices als typisch für alle ABC-Transporter.

1.5.2 Vorhersage der Tertiärstruktur

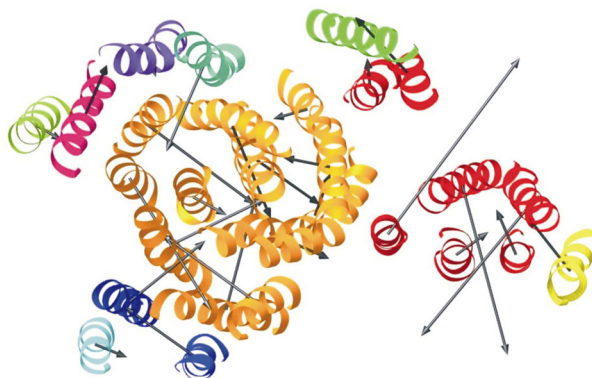
1.5.2.1 Die Grundlagen Struktur basierter Vorhersagemethoden

Für etwa 70 % der Interaktionen zwischen TM-Segmenten werden vor allem schwache Dipol-Dipolkräfte vom van der Waals-Typ in dicht gepackten hydrophoben Kontaktflächen verantwortlich gemacht [87]. Die daran beteiligten Aminosäuren sind analog derer wasserlöslicher globulärer Proteine konserviert, während die restlichen zur Fettschicht der Membran weisenden Reste stärker variabel sind [158, 159]. Der Modelbau von Membranproteinen lässt sich aber nicht einfach durch das Vertauschen der Innen-Außen Orientierung von dem globulärer Proteine ableiten [160].

Die Aminosäurekomposition der im Proteininnern verborgenen Kontaktflächen und die Packungsdichte sind aber nur in erster Näherung relativ unabhängig von dem Umgebungsmilieu definiert [161]. Der Austausch an der Proteinoberfläche gelegener hydrophober gegen hydrophile Aminosäuren zur Generierung stabiler und funktionstüchtiger „wasserlöslicher Membranproteine“ ist nicht zuletzt deshalb bisher nicht geglückt [162, 163], (Boris Steipe pers. Mitteilung). In Kapitel (3.4.1.1) wird aus diesem Grund die Aminosäurezusammensetzung der unterschiedlichen Kontaktflächen der TM-Abschnitte genauer untersucht (DIP; Abbildung 32).

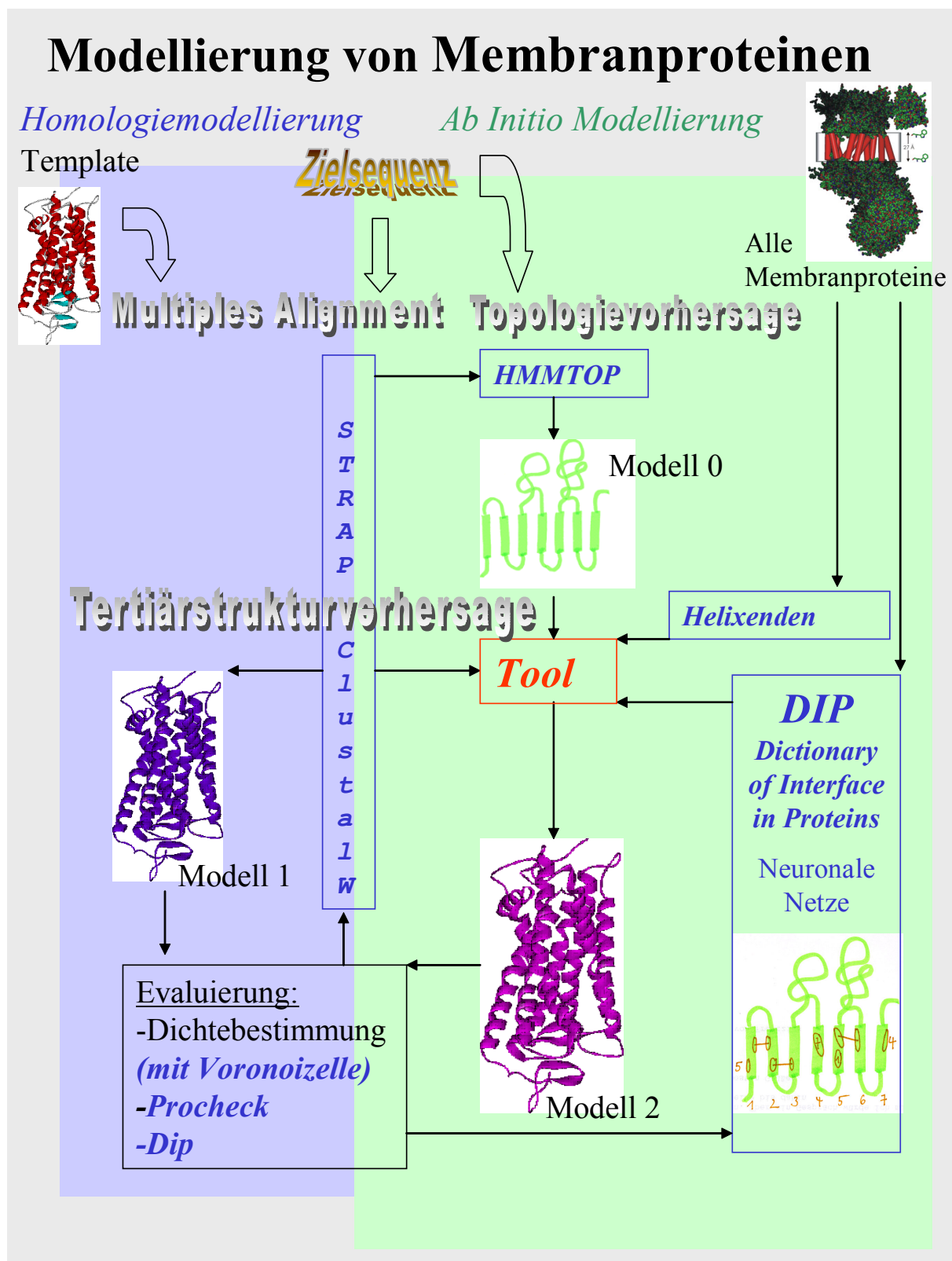
Die Oligomerisierung von Membranproteinen wird unterstützt durch Präorientierung membranintegraler Domänen sowie ihre lokale Konzentration im zweidimensionalen Raum der Lipidmembran [164]. Der Konzentrationseffekt kann durch Akkumulation in cholesterinreichen Membranmikrodomänen noch verstärkt werden, wobei die potentielle Beeinflussung durch Interaktionen mit spezifischen Lipiden bisher kaum erforscht ist [122]. Die Aminosäurekomposition im Übergangsbereich vom hydrophoben zum hydrophilen Membranmilieu ist im Besonderen für die Ausrichtung der TM-Abschnitte mitverantwortlich und wird deshalb im Detail analysiert (Kapitel 2.1).

Abbildung 23: Vektorielle Darstellung konservierter TM-Helixbereiche [160]



Die konservierten Kontaktbereiche in TM-Helices sind weitgehend im Innern des Proteins (hier: Monomer der Rinder Oxidoreduktase) verborgen. In dieser Abbildung verweisen Vektoren auf diese konservierten Bereiche (in Pfeilrichtung). Derartige Vektoren dienen in einigen Tertiärstrukturvorhersage Programmen zur Ausrichtung der TM-Helices nach erfolgter Sekundärstrukturvorhersage. Welche Helix mit welcher kontaktiert, kann dabei allerdings nicht vorhergesagt werden [95].

Abbildung 24: Modellierung von Membranproteinen (Übersicht)



Modell 0 erhält man nach erfolgter Sekundärstrukturvorhersage (z. B. mit HMMTOP, [139]). Durch Homologiemodellierung entsteht unter Verwendung multipler Alignment Tools (z. B. STRAP, [133]) und eines Modellers (z. B. Swiss PDB Viewer, [165]) **Modell 1**. Alternativ kann durch Analyse der Helixenden und der Membranproteininterfaces z. B. mit Hilfe neuronaler Netze **Modell 2** entwickelt werden. Die Ergebnisse dieser Methoden können miteinander verglichen werden. Zur Evaluierung der Ergebnisse dienen ferner Standardmethoden zur Bestimmung der Dichte und der Strukturqualität (Procheck; [166]).

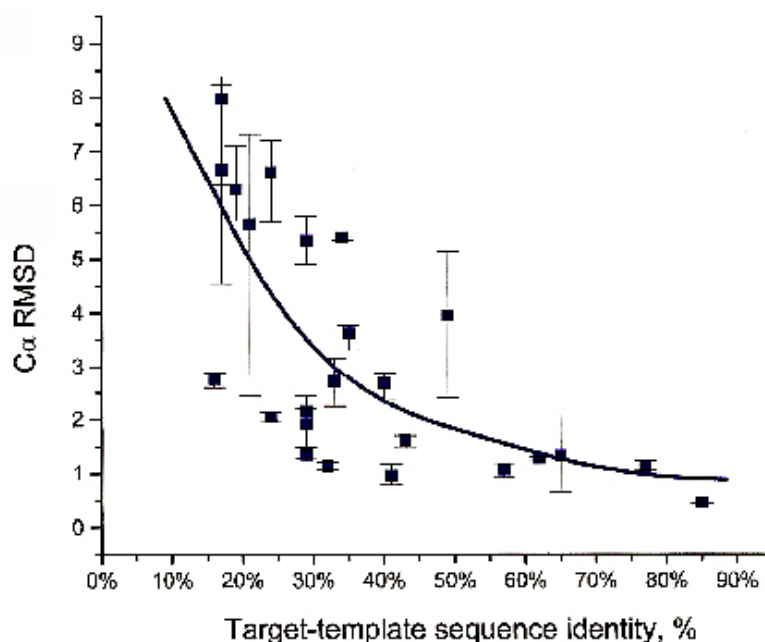
1.5.2.2 Homologiemodellierung von Membranproteinen

Die erfolgreiche Einschränkung der Freiheitsgrade bei der Assoziation membranständiger Helices im Rechner gestützten Raum funktioniert nicht ohne zusätzliches Wissen weiterer Faltungsdeterminanten [167, 168]. Die bisher gefundenen Interaktionsmotive wie das GXXXG Motiv [169], oder das Leuzinzipper Motiv [170] werden auch bei Helices globulärer Proteine gefunden [171]. Für die Evaluierung der Stabilität und zur Verbesserung der Strukturvorhersage von Membranproteinen müssen demgemäß auch eine Vielzahl anderer Parameter berücksichtigt werden. Viele davon sind bisher nur wenig verstanden, oder gelten als schwer quantifizierbar [13].

Erfolgreiche Modellierungen der Tertiärstrukturen von Membranproteinen gehen deshalb hauptsächlich auf den Nachbau bereits bekannter Strukturen zurück. Dies ist allerdings erst ab einer Sequenzhomologie von mehr als 40-50 % zwischen der Zielsequenz und dem Template möglich [172] (Abbildung 25). Der Erfolg der Homologiemodellierung und der struktur basierten Vorhersagen von Membranproteinen wird dementsprechend gleichermaßen durch die geringe Verfügbarkeit von Strukturdaten eingeschränkt.

In dem letzten Kapitel des Ergebnisteils wird die Geometrie der TM-Abschnitte genauer untersucht. Bisher wurde nicht überprüft, in welchem Maße die beim Modelbau von globulären Helices verwendeten Standard $\phi - \psi$ - Winkel auch für die Helices in den TM-Abschnitten Gültigkeit besitzen. Die gefundenen Abweichungen müssen in diesem Kapitel außerdem unter besonderer Berücksichtigung der allgemein geringeren Auflösung der Membranprotein Strukturen diskutiert werden.

Abbildung 25: Homologiemodellierung und Target- Template Sequenzidentität [172]



Die Qualität eines Strukturmodells kann mit Hilfe des RMSD dargestellt werden. Die Sequenzidentität zwischen dem verwendeten Template (Originalstruktur) und dem Target (Zielstruktur) zeigt eine lineare Abhängigkeit zur Qualität der modellierten Struktur. Erst ab einer Sequenzidentität von mehr als 40 % liegt der Wert des Ca- RMSD unterhalb eines Schwellenwertes, welcher ein vernünftiges Maß an Strukturidentität anzeigt [172].

1.6 Aufgabenstellung

- 1) Gibt es besondere Merkmale der Enden von TM-Helices? Lassen sich Aminosäurepräferenzen erkennen, welche spezifisch für das Milieu der Grenzbereiche der Membran sind? Gibt es Struktur motive an den Helixenden die einen besonderen Beitrag zur Ausbildung der Tertiärstruktur leisten können?
- 2) Kann der Übergangsbereich vom hydrophoben zum hydrophilen Milieu für Membranproteinstrukturen bestimmt werden?
- 3) Wie sehr unterscheidet sich die Aminosäurezusammensetzung α -helikaler Membranabschnitte von α -helikalen globulären Proteinen bzw. von β -Barrel Membranproteinen?
- 4) Sind Membranhelices so dicht gepackt wie Helices globulärer Proteine? Wie ist die Atom- bzw. Aminosäurezusammensetzung der verschiedenen Helixkontakte in Membranproteinen im Vergleich zu wasserlöslichen globulären Proteinen?
- 5) Führt die spezifische Aminosäurezusammensetzung α -helikaler Membranproteine zu einer besonderen Helixgeometrie? Was ist die durchschnittliche Länge und Ganghöhe eines hydrophoben helikalen Membranabschnitts? Gelten die Standardwinkel der α -Helix globulärer Proteine auch für Helices in der Membran? Gibt es milieubedingte Unterschiede der Geometrie von Wasserstoffbrücken der α -Helix in Membranproteinen und globulären Proteinen?

2 Methoden

2.1 Die Helixcaps

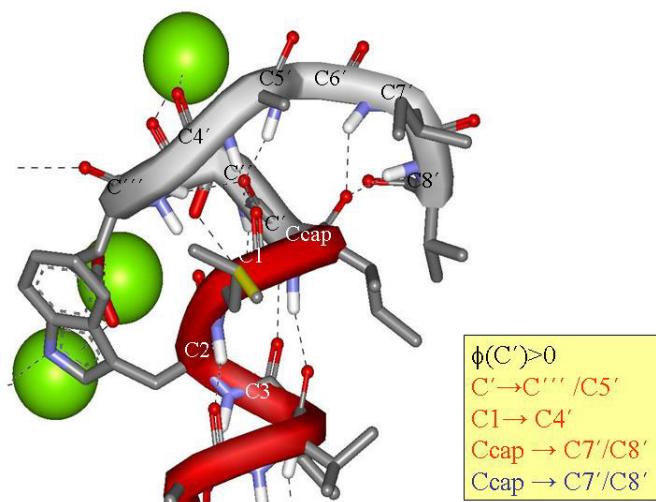
2.1.1 Typisierung von Helixcaps

Die Enden von Helices sind in globulären Proteinen häufig durch besondere Struktur motive, die Helixcaps begrenzt [173, 174]. Zwei Drittel der Reste einer Helix mit der für wasserlösliche Proteine repräsentativen Länge von 13 Aminosäuren sind in diese hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen mit Resten des nachfolgenden Loops involviert. Anstelle der regelmäßigen Anordnung gegabelter H-Brücken innerhalb der Helix (Abbildung 58) treten jetzt, insbesondere N-terminal, vielfach Interaktionen polarer Seitenketten mit der Hauptkette. Die Helixcaps sind somit besondere Motive zur Stabilisierung des Übergangsbereichs von einer Helix zur benachbarten Sekundärstruktur [175].

Diese Supersekundärstrukturen können in einer sehr frühen Phase der Proteinfaltung entstehen und beeinflussen dann den Faltungsprozess entscheidend [176]. Die Geometrie dieser häufigen Strukturelemente wurde für globuläre Proteine deshalb und auf Grund der Beutung für die Modellierung bereits detailliert untersucht. Demnach können 7 Cap Motive entsprechend der Besetzung bestimmter Sequenzpositionen mit Aminosäuren mit definierten physiko-chemischen Eigenschaften unterschieden werden [173]. (Bsp. Schellmann Motiv, Capping Box, s. a. Abbildung 39).

Die Torsionswinkel (ϕ , ψ) ab dem C-, bzw. N-Cap, also der ersten, bzw. letzten Aminosäure der Helix weichen dabei in der Regel um mindestens $\pm 15^\circ$ von den Standardwerten einer α -Helix (-65° , -40°) ab. Die Einteilung der verschiedenen Cap Motive erfolgt entsprechend der vorherrschenden hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen innerhalb des Caps. Die Wechselwirkungen zwischen Sequenznachbarn (Aminosäuren in i , $i \pm 2$ bis 6 Position) sind dabei in der Regel häufiger, als die weit voneinander entfernter Reste ($i \pm 7$ bis 15):

Abbildung 26: Helix 6 des Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w)



Die Helix (rot) endet mit einem C-Cap (grau). Die Positionen welche zur Helix gehören, werden aufsteigend nummeriert, diejenigen außerhalb erhalten zunehmend Striche (ebenso am N-Cap). In dem gelben Kästchen sind hydrophobe (blau) und hydrophile Wechselwirkungen (rot, links: H-Brücken gestrichelt) aufgelistet, welche dieses Cap näher charakterisieren. Die Flexibilität der beiden Gly in C' und $C4'$ Position führt zu diesem Sonderfall eines „long range“ Caps. Die Wassermoleküle im Protonenkanal sind als grüne Kugeln eingezeichnet.

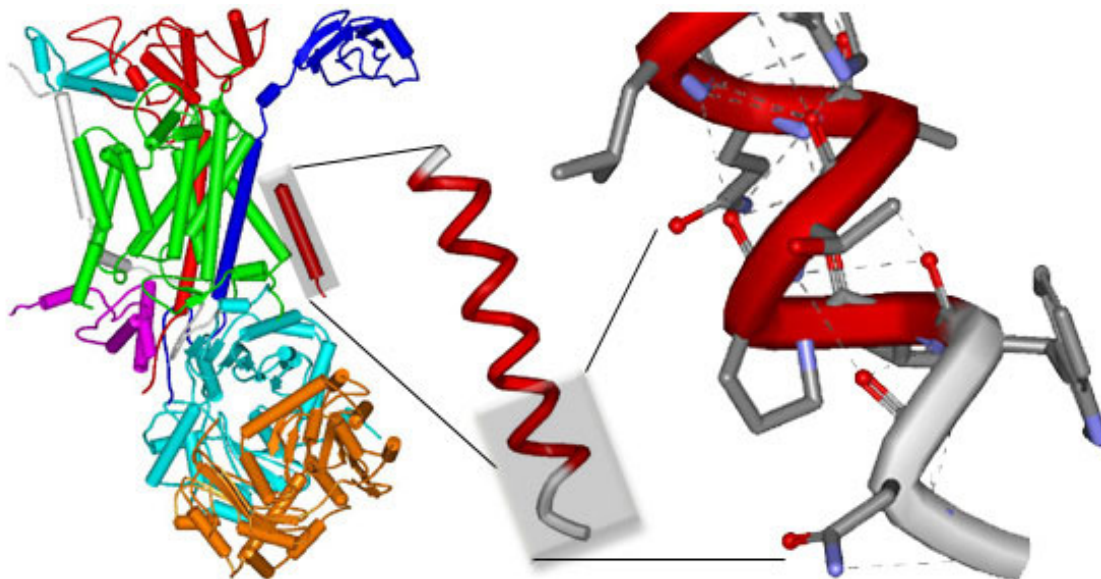
2.1.2 Berechnung der Aminosäurepräferenzen

Die normalisierten Aminosäurepräferenzen wurden zunächst mit Hilfe von Formel 1 für jede einzelne Helix-Cap Position (Cap ± 5 Aminosäuren) berechnet. Als Cap Position wurden dazu die erste und letzte Aminosäure der Helix entsprechend der Angaben in dem jeweiligen .sco File genommen. Das dazugehörige Programm (Contact.exe) nutzt u. a. das Ausgabeformat von DSSP [177] zur Evaluierung der Sekundärstrukturen [93]. Im Gegensatz zu jenem wird aber eine stärker geknickte Helix nicht als zwei kurze Einzelhelices ausgegeben. Bei Contact.exe führen praktischerweise somit in der Regel nur Loops und Turns zum Abbruch der Sekundärstrukturen.

Die Fraktion i in Helices ist die Häufigkeit einer Aminosäure i in einer bestimmten Cap Position j gemittelt durch die Anzahl der Helices (TM-Helices: $n=109$, EM-Helices (außerhalb der Membran gelegene Helix): $n=125$). Die Fraktion i im Datensatz ist die Gesamthäufigkeit einer Aminosäure, gemittelt durch die Anzahl aller Reste (n (TM-Helices) = n (EM Helices) = 8390). Der Quotient dieser beiden Fraktionen ergibt dann die normalisierten Aminosäurepräferenzen für jede Cap Position. Die Aminosäurepräferenzen an den Enden der TM-Helices wurden dann mit den entsprechenden Cap Positionen der außerhalb der Membran liegenden EM-Helices verglichen.

$\frac{\text{Fraktion } i \text{ in Helices}}{\text{Fraktion } i \text{ im Datensatz}} = \frac{\frac{\text{Häufigkeit des Restes } i \text{ in Helixposition } j}{\text{Anzahl der Helices}}}{\frac{\text{Häufigkeit des Restes } i \text{ im Datensatz}}{\text{Anzahl des Restes im Datensatz}}}$	Formel 1
--	----------

Abbildung 27: Analyse eines Caps am Beispiel der Untereinheit K des Cytochromes bc1 (1be3)



Schematische Darstellung der Extraktion eines N-Caps der TM-Helix der Untereinheit K des Cytochromes bc1 (1be3). In einem ersten Schritt wurde festgestellt, welchem Datensatz die Helix angehört (in diesem Bsp. eine TM-Helix). In weiteren Schritten werden die Helixenden „extrahiert“ sowie die einzelnen Aminosäurepositionen bestimmt und statistisch bewertet (Automatisierung in VBA).

2.1.3 Statistische Bewertung der Aminosäurepräferenzen

Die Unterschiede zwischen den normalisierten Aminosäurepräferenzen der beiden Datensätze lassen sich durch Eintragung jeder Cap Position in eine Vierfeldertafel mit zwei dichotomen Merkmalen X_1 und X_2 auf Signifikanz prüfen. Merkmal X_1 ist das Untersuchungsmerkmal. Sein jeweiliger Wert bezeichnet das Vorhanden-, bzw. das Nichtvorhandensein einer Aminosäure in einer bestimmten Position. Mit Hilfe des Gliederungsmerkmals X_2 werden die Summen der X_1 Werte, also die Häufigkeit mit der eine bestimmte Aminosäure in einer definierten Position gefunden wird, zwischen beiden Datensätzen verglichen [178].

Tabelle 4: Eintragung der Analysemerkmale der Helixcaps in eine Vierfeldertafel

<i>Untersuchungsmerkmal X_1:</i> <i>Aminosäure i in Position j</i>	<i>Gliederungsmerkmal X_2:</i>		Σ
	<i>TM-Helices</i>	<i>EM- Helices</i>	
<i>vorhanden</i>	n_{11}	n_{21}	$n_{1.}$
<i>Nicht vorhanden</i>	n_{12}	n_{22}	$n_{2.}$
Σ	n_1	n_2	$n_{1.} + n_{2.} = n$

Der Test zum Vergleich der Anteile zweier voneinander unabhängiger Stichproben (für hinreichend große Stichproben gilt näherungsweise die Standardnormalverteilung) erfolgt durch Überführen der Werte aus der Vierfeldertafel in Formel 2. Das Ergebnis (Testgröße) kann direkt mit dem Signifikanzniveau α verglichen werden. Ein Betrag $> 1,28$ deutet auf einen „auffälligen“ Unterschied hin ($z_{0,90}$), ein Betrag $> 1,96$ belegt einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Datensätzen ($z_{0,975}$).

$$Testgröße = \frac{\sqrt{n} * (n_{11} * n_{22} - n_{12} * n_{21})}{\sqrt{n_1 * n_2 * n_{1.} * n_{2.}}}$$

Formel 2

2.2 Abmessung helikaler Membrandomänen

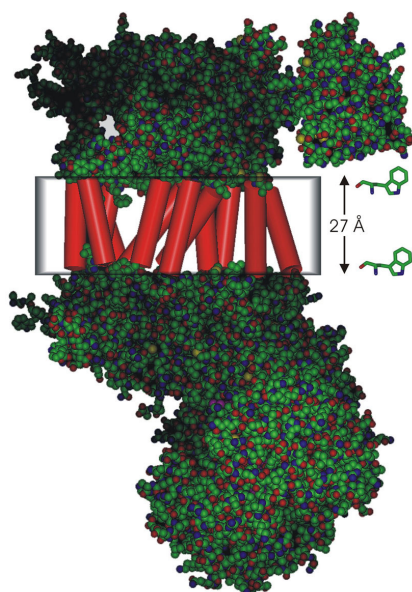
2.2.1 Bestimmung der Position des Membran-Wasser Interfaces

Der Einfluss des hydrophoben Membranabschnitts muss getrennt vom Übergangsbereich zum polaren Milieu der Lipidköpfchen und des Solvents untersucht werden [95, 136] (Abbildung 11). Die Anfangs- und Endpunkte von TM-Helices liegen aber aufgrund des Helixdipolmoments außerhalb des lipophilen Membranbereichs und fallen in der Regel nicht mit den tatsächlichen Membrangrenzen zusammen [88]. Leider bieten nur einige wenige Kristallstrukturen Atomkoordinaten für Lipidmoleküle oder Wasser und damit ausreichende Information zur direkten Bestimmung der Membrangrenzen (Abbildung 4, Abbildung 13) [39, 40, 179].

Ein hilfreiches Kriterium zum Erkennen der innerhalb der Membrangrenzen liegenden helikalen Proteinabschnitte ist deshalb die Hydrophobizität der beteiligten Aminosäurereste. Bestehende Sekundärstruktur Vorhersageprogramme für Membranproteine wie z. B. TMHMM nützen dieses Feature [139]. Die Länge und die exakte Position der membran spannenden Abschnitte werden mit Hilfe dieser Programme allerdings nur selten richtig vorhergesagt [131, 180].

Zur Definition der TM-Abschnitte wurde in dieser Arbeit deshalb ausschließlich die Wasserlöslichkeit der sichtbar an der Oberfläche der untersuchten Proteinstrukturen gelegenen Aminosäuren berücksichtigt. Diese Analyse erfolgte mit Hilfe des WebLab Viewers Pro 4.0. Als hydrophob werden dabei alle Reste mit einem Wert $\geq 0,7$ auf der Hydrophobizitätsskala von [181] (Tabelle 8) gezählt.

Abbildung 28: Die Festlegung der Membrangrenzen (Übersicht)



Die Festlegung der Membrangrenzen ist für die Beantwortung der in Kapitel 1.6 gestellten Fragen von zentraler Bedeutung. Sie stellt gewissermaßen die Grundlagen aller weiteren Analysen in dieser Arbeit dar. Daher wurden alle zur Verfügung stehenden Mittel genutzt. Für einige der Strukturen, wie den Chloridkanal gelang es aber nicht den Membranverlauf mit Hilfe hydrophober bzw. aromatischer Aminosäuren klar zu definieren. In diesem Falle wurden die Grenzflächen zunächst mit Hilfe mindestens dreier repräsentativer Reste fixiert. Die Ebene durch die Ca Atome dieser Reste wurde dann als Membranverlauf genommen. Die Annahme, dass die Grenzfläche zwischen Protein und Membran näherungsweise eine Ebene beschreibt ist zwar nicht immer gegeben [182], wurde für diese Untersuchung aber als näherungsweise richtig vorausgesetzt.

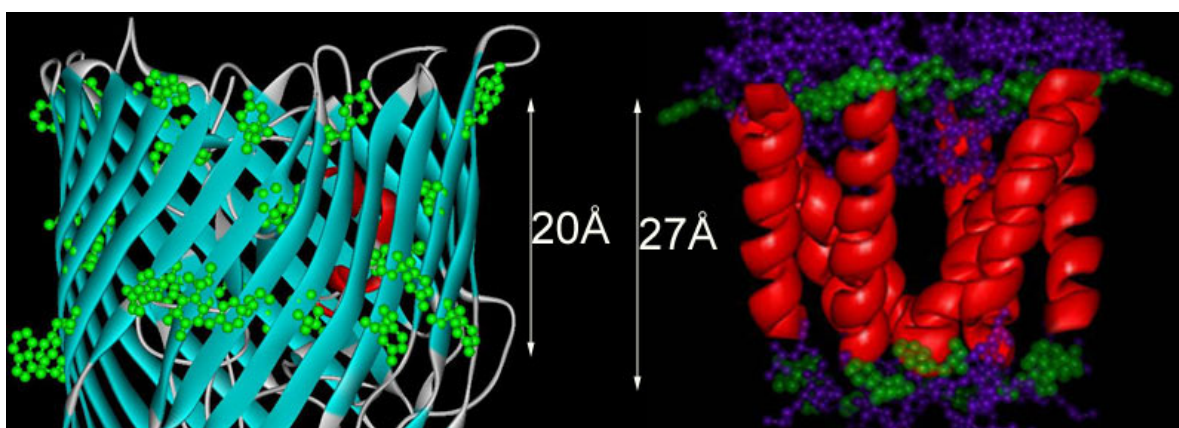
Aromatische Aminosäuren, besonders Trp und Tyr bevorzugen Positionen im Übergangsbereich vom lipophilen zum wässrigen Milieu [183, 184]. Eine deutliche Abgrenzung der zwischen solchen Aromatengürteln gelegenen Proteinabschnitte gelingt allerdings nur bei einem Großteil der β -Faltblätter, wie z. B. bei den Porinen [14, 37] (Abbildung 29) und bei einigen helikalen Membranproteinen wie dem Kaliumkanal, dem Photosystem I oder der Cytochrome C Oxidase [183].

2.2.2 Berechnung der Membran-Durchschnittsebenen und der Ganghöhe der Helix

Mit Hilfe des Programms Membran.exe wurden die „Durchschnittsebenen“ durch die ausgewählten Aminosäurepositionen (Abbildung 29) erzeugt. Dabei werden auf jeder Membranseite drei C α -Atome ausgewählt, welche die angegebenen Membrangrenzen näherungsweise am Besten repräsentieren. Als nächstes wird getestet, ob die beiden gedachten Ebenen parallel zueinander sind (Abweichungen davon $< 10^\circ$). Die innere und äußere Ebene können danach durch die Angabe der x, y, z- Koordinaten der Endpunkte einer Geraden, senkrecht zur Membran ausreichend definiert werden (Tabelle 9). Wichtig sind diese Koordinaten zur Bestimmung und die Darstellung der Kontaktflächen (Kapitel 2.4.1, Abbildung 32).

Für die Berechnung der Aminosäureanzahl pro Helixwindung, bzw. den Anstieg pro Rest wurden zusätzlich lokale Achsen bestimmt. Dazu werden fünf Reste auf- und abwärts in der Sequenz verwendet, weshalb diese Analyse nur für die Reste mit einem entsprechenden Abstand zu den Helixtermini durchgeführt werden konnte.

Abbildung 29: Aromatengürtel (grün) bei dem β -Barrel FhuA (1by5) und dem Kaliumkanal (1bl8)



β -Faltblätter besitzen eine deutliche Häufung an aromatischen Aminosäuren im Übergangsbereich vom hydrophoben Membranmilieu zur hydrophilen Umgebung. Die Membrangrenzen lassen sich mit Hilfe dieses Kriteriums modellieren und liegen bei diesen in der äußeren Membran von Bakterien positionierten Strukturen etwa 20 Å voneinander entfernt. In einigen wenigen Fällen gelingt auch bei helikalen Membranproteinen eine Bestimmung der Membrangrenzen an Hand des Aromatengürtels (Abstand 27 Å).

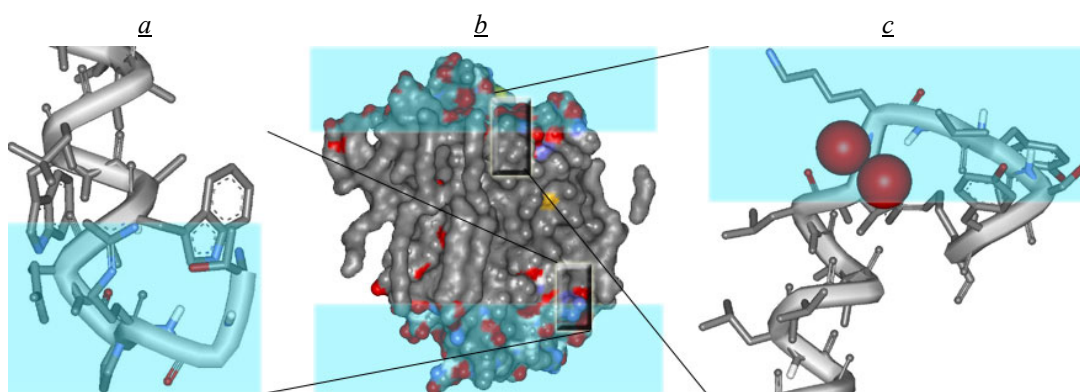
2.2.3 Modellierung von fehlenden Wassern und polaren Lipidköpfchen

Der Energiegewinn bei Insertion einer Polypeptidkette von 22 bzw. 26 hydrophoben Resten in eine künstliche Membran, liegt bei Werten zwischen -6 kcal mol^{-1} bzw. $-8,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ [185, 186]. Die Ausbildung von H-Brücken trägt mit -4 bis -5 kcal mol^{-1} den Hauptanteil an dem Gesamtenergiegewinn und gilt deshalb als Motor für die Faltung einer Polypeptidkette beim Übergang in die Membran [83]. Das Einbetten hydrophober bzw. hydrophiler Aminosäureseitenketten in das lipophile Milieu der Membran, bzw. in den polaren Bereich der Lipidköpfchen (Abbildung 51) erhöht außerdem diesen Energieeintrag (Tabelle 1).

Die Entropieabnahme durch Fixierung der Seitenkettenrotamere und Lipide in bestimmten Positionen vermindert den Enthalpiebetrag bei Einlagerung einer Polypeptidkette in die Membran. Die Ausbildung von H-Brücken ist demnach die entscheidende Antriebskraft für die Bildung und Stabilisierung von Sekundärstrukturen in der Membran [187]. Gly und in einigen Beispielen Pro nehmen daher im hydrophoben Milieu der Lipiddoppelschicht ebenfalls die für α -Helices typischen Torsionswinkel ein [188] (Abbildung 44, Abbildung 52).

Mit Hilfe der „in der Kristallstruktur fehlenden H-Brücken“ ist es deshalb möglich, das Membraninterface für Bakteriorhodopsin (1c3w) sichtbar zu machen (s. a. Abbildung 30). Der Membranverlauf dieses Proteins konnte somit mit Hilfe zweier Methoden bestimmt werden. Neben dieser neuen Herangehensweise wurden die Membranebenen durch reine Hydrophobizitätsanalyse unter der zusätzlichen Einbeziehung der Lipidkoordinaten modelliert. Beide Methoden führen zu fast identischen Ergebnissen, während die entsprechenden Angaben des Vorhersageprogramms TMHMM (Abbildung 18) um bis zu zwei Reste von diesen Ergebnissen abweichen.

Abbildung 30: Modellierung des Membraninterfaces mit Hilfe von H-Brücken (1c3w)



Wasserstoffdonatoren bzw. Akzeptoren mit fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen (sowohl der Haupt, als auch der Seitenkette) sind farblich gekennzeichnet (blau, bzw. rot). a) und c) Positionierung C-Terminus von Helix 1 in der Lipiddoppelschicht. Fehlende Wasserstoffbrücken sind fast ausschließlich im Bereich der polaren Lipidköpfchen (hellblauer Abschnitt) zu finden. b) Der Proteinbereich, der mit dem hydrophoben Membranabschnitt in Kontakt steht, ist deshalb nahezu vollständig grau.

2.3 Der Referenzdatensatz

Die Aminosäurezusammensetzung und die Geometrie helikaler TM-Abschnitte wird mit einer Reihe von Referenzdaten verglichen (Tabelle 10). Als Referenzgruppen wurden neben einer Auswahl β -Barrel Membranproteine, lange α -Helices globulärer Proteine verwendet (s. Legende Tabelle 10). Diese Helices sind bezüglich ihrer überdurchschnittlichen Länge und meist geringen Krümmung den TM-Helices ähnlicher [189], (Abbildung 42) als die größeren von [190], bzw. [145] benutzten Datensätze, die in dieser Arbeit ebenfalls diskutiert werden.

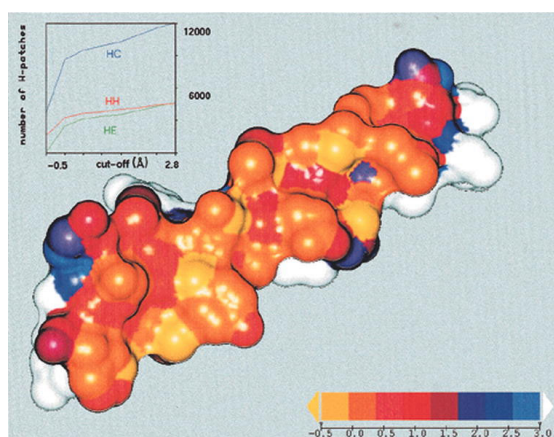
2.4 Die Analyse der Protein-Kontaktflächen

Die Aminosäurezusammensetzungen der TM-Abschnitte von α -helikalen Membranproteinen und von einigen β -Barrel Membranproteinen werden weiterhin nach der Art des Kontakts, zu einer benachbarten Sekundärstruktur, oder zum wässrigen bzw. zum lipophilen Milieu spezifiziert (Abbildung 32). Die Enden der helikalen Membranabschnitte liegen im polaren Bereich der Lipiddoppelschicht bzw. im wässrigen Milieu ($_{pol}$) (Abbildung 30). Die Aminosäurezusammensetzung (der Kontakte) der Helixenden wird in dieser Arbeit erstmals getrennt von dem zentralen Helixabschnitt (TM-Helix), welcher innerhalb des lipophilen Bereichs der Membran ($_{lip}$) liegt untersucht.

2.4.1 Die Berechnung der Protein-Kontakte

Die Zusammensetzung der Kontaktflächen wurde mit Hilfe von Contact Exe erstellt [93]. Dieses Programm berechnet alle innerhalb eines definierten Abstands Maßes liegende Kontakte („Cut off“), welche die (van der Waals Oberflächen der) Atome einer definierten Sekundärstruktur mit den benachbarten Sekundärstrukturen bzw. mit dem Umgebungsmilieu verbindet. Die verwendeten Radien entsprechen dem Atomradiensatz von [191].

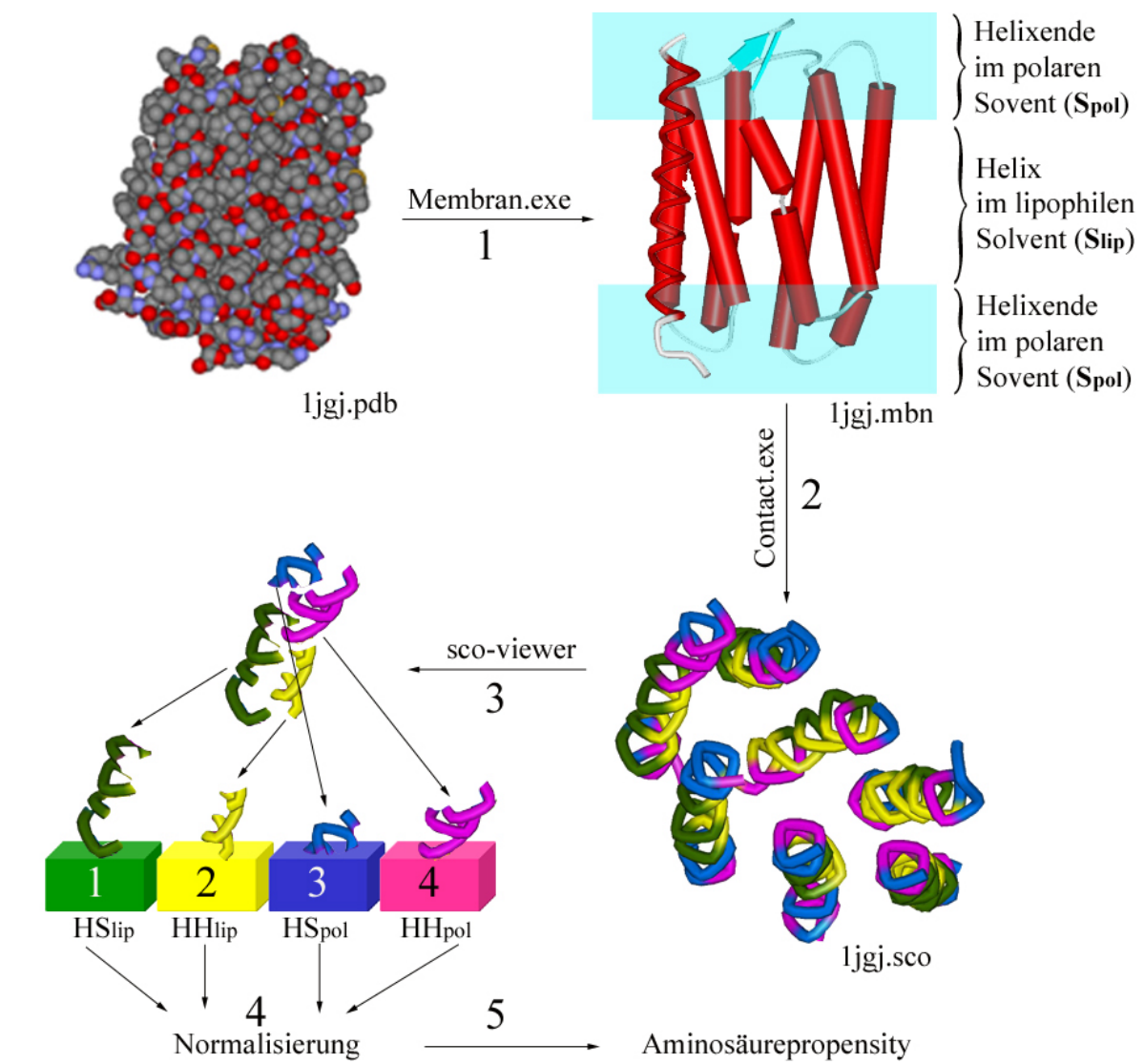
Abbildung 31: Patchform in Abhängigkeit vom Cut off [93]



Die Kontaktfläche zwischen Helix 1 (14-76) und Helix 2 im Ferretin (1fha) ist entsprechend der Cut off Skala (r. u.) eingefärbt. Bei einem kleinen Cut off sind weniger Atome in Kontakt mit der Nachbar Helix. Das Längen-, Breiten-, Tiefenverhältnis dieses Patches beträgt dabei unabhängig vom gewählten Cut off und der Art des Kontakts bei globulären wasserlöslichen Proteinen ungefähr 3:2:1. Zur optimalen Unterscheidung der Aminosäure- und Atomzusammensetzung und der Geometrie der verschiedenen Kontakttypen wurde für die Untersuchung der Membranproteine ein Cut off von 0 Å verwendet.

Zur Bestimmung der Solvent exponierten Kontaktflächen wird die „Conolly-Oberfläche“ des isolierten Proteins berechnet [192]. Die Packung des so modellierten wässrig-polaren bzw. lipophilen Milieus mit dem Protein ist daher gleichermaßen ideal. Mit Hilfe von Membrane.exe werden die Membranebenenpunkte erzeugt und damit die Differenzierung zwischen den Proteinkontakten mit dem polaren und dem lipophilen Milieu erreicht (Abbildung 32, Tabelle 9).

Abbildung 32: Übersicht der Analyse der Zusammensetzung helikaler TM-Abschnitte



1) Mit Hilfe von Membran.exe werden die Membranebenenpunkte erzeugt (Ausgabedatei: .mbn). Dieser Schritt ermöglicht die Auftrennung zwischen den Helixabschnitten, welche den hydrophoben Membranbereich durchspannen und den Helixenden, welche im polaren Bereich der Lipiddoppelschicht bzw. im Solvent positioniert sind.

2) Contact.exe berechnet alle innerhalb von 0-2,8 Å liegenden Kontakte einer TM-Helix (Ausgabedatei: .sco): HS_{pol} : Helix-Solvent_{polar}, HS_{lip} : Helix-Solvent_{lipophil}, HH_{pol} : Helix-Helix_{polar}, HH_{lip} : Helix-Helix_{lipophil}.

3) Mit Hilfe des Sco-Viewers können die Kontakte nach Wahl eines bestimmten Cut Offs visualisiert und nach Art des Kontakts ausgegeben werden [193]. Die Daten aller untersuchten Membranproteine werden nach diesem System gesammelt und entsprechend der vier unterschiedlichen Kontakttypen gepoolt.

4-5) Im Anschluss werden die Daten normalisiert und die Aminosäurepropensities berechnet.

2.4.2 Normalisierung der Aminosäuren-Häufigkeiten

In Schritt 1 (Abbildung 32) werden die Helices bezüglich des umgebenden Solvents (Lipide: S_{lip} und wässrig-polar: S_{pol}) in einen zentralen Helixabschnitt (TM-Helix) und die beiden Helixenden aufgetrennt. Die Aminosäurezusammensetzung dieser beiden Datensätze ist in Tabelle 10 aufgelistet. Mit Hilfe dieser Werte kann der prozentuale Anteil der Aminosäurekontakte innerhalb der vier verschiedenen Kontakttypen wie folgt normalisiert werden:

Große, sperrige Seitenketten führen wie beim Trp zu einer hohen Anzahl an Kontakten, während kleine Aminosäuren (z. B. Gly) erst mit zunehmendem Cut off an Bedeutung gewinnen (Schritt 3, Abbildung 32). Die durchschnittliche Über- bzw. Unterrepräsentation der größeren bzw. kleineren Reste in den Helix Kontakten im Vergleich zur relativen Aminosäurezusammensetzung in der gesamten Helix (Schritt 1) wurde als Korrekturmaß (C) für dieses Ungleichgewicht verwendet (Formel 3, Tabelle 5).

$$C = \frac{2a + 2b}{(A1' + A2') + (A3' + A4')} = \frac{\text{Fraktion in Helices}}{\text{Fraktion in Patches}} \quad \text{Formel 3}$$

$$A1 = A1' * C \quad \text{Formel 4}$$

* C = Korrekturfaktor der Aminosäure

a bzw. b = prozentualer Anteil der Aminosäure in der dem zentralen Helixabschnitt bzw. an den Helixenden A_1 bzw. A_1' und A_2 bzw. A_2' = korrigierter bzw. nicht korrigierter prozentualer Anteil der Aminosäure an HS_{lip} (Abbildung 32, Pool 1) und an HH_{lip} (Pool 2)

A_3 bzw. A_3' und A_4 bzw. A_4' = korrigierter bzw. nicht korrigierter prozentualer Anteil der Aminosäure an HS_{pol} (Abbildung 32, Pool 3) und an den HH_{pol} (Pool 4)

Tabelle 5: Korrekturfaktor zur Normalisierung des Anteils an den Kontakten

AS	GLY	ALA	SER	VAL	PRO	HIS	MET	THR	ILE	CYS	ASN	LEU	LYS	ARG	GLN	ASP	GLU	PHE	TYR	TRP
* C	2,1	1,6	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,1	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	0,8	0,6	0,5	0,4
atoms	4	5	6	7	7	10	8	7	8	6	8	8	9	11	9	8	9	11	12	14

Mit Hilfe des Korrekturfaktors C werden die prozentualen Anteile der Aminosäuren an den Kontaktflächen v. a. hinsichtlich der Größe des Rests normalisiert (Formel 4). Die Präferenz einer Aminosäure für eine der vier Kontaktflächen kann aus dem Ergebnis von Formel 4 und dem prozentualen Anteil der Aminosäure in der gesamten Helix berechnet werden (Formel 5). Die Formel zeigt, dass die Präferenzen ohne Korrekturfaktor berechnet werden.

$$P1 = \frac{2A1}{a+b} = \frac{2A1'}{a+b} * C = \frac{4A1'}{A1' + A2' + A3' + A4'} \quad \text{Formel 5}$$

P_1, P_2, \dots = Präferenz einer bestimmten Aminosäure in einem bestimmten Patch

2.4.3 Die Berechnung der lokalen Dichte

Die lokale Packungsdichte (PD_{loc}) lässt sich aus dem Quotienten des atomaren Van der Waals Volumen V_{vdW} [194] und dem gesamten Volumen des Atoms V_{tot} berechnen:

$$PD_{loc} = \frac{V_{vdW}}{V_{tot}} \quad \text{Formel 6}$$

Zur Berechnung von PD_{loc} muss der zur Verfügung stehende Raum unter den einzelnen Atomen aufgeteilt werden. Die hierzu verwendete Methode leitet sich von der Voronoi-Prozedur ab, welche den gesamten verfügbaren Raum in polyedrische Körper um die Atommittelpunkte aufteilt [195]. Diese Methode verwendet hyperboloide Flächen anstelle gerader Trennebenen, um eine möglichst realistische Aufteilung der Volumina zu erreichen.

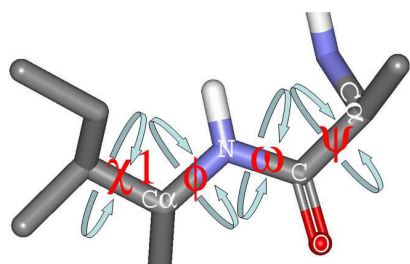
2.5 Die Helixgeometrie

2.5.1 Definition der Torsionswinkel

Die Architektur einer Polypeptidkette lässt sich u. a. mit Hilfe der Wasserstoffbrückenbindungen und der Torsionswinkel zwischen den Hauptketten (ϕ , ψ , ω) und den Haupt- und Seitenkettenatomen (χ_1) charakterisieren [177, 196]. Mit Hilfe der Untersuchung dieser geometrischen Charakteristika können die für das Membranmilieu geltenden Sekundärstruktureigenschaften spezifiziert werden.

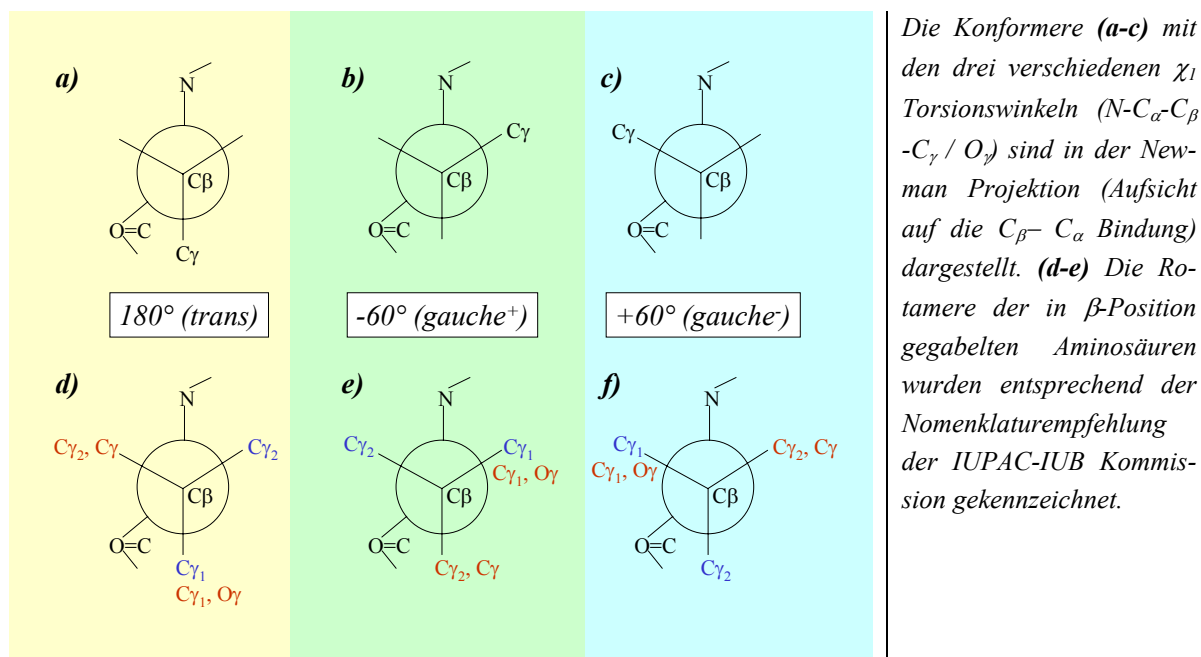
Im Ramachandran ($\phi - \psi$) Plot wird dieser Zusammenhang graphisch dargestellt [197] und bewertet [198] (Abbildung 52).

Abbildung 33: Haupt- und Seitenkettenwinkel einer α -Helix



*Am stärksten eingeschränkt ist die Drehung um die Peptidbindung (ω), für die keine Abweichungen von dem erwarteten Standardwert gefunden wurden. ϕ - und ψ -Winkel clustern in einem für α -Helices typischen Bereich [197]. Die Konformation der Seitenketten (χ_1) ist auf die Rotamere *gauche*⁺, *gauche*⁻ und *trans* beschränkt (Abbildung 34).*

Der Konformationsraum der Seitenkettenwinkel (χ_1 , χ_2 , ...) ist auf wenige Rotamere beschränkt. Für alle Aminosäuren außer Ala und Gly (besitzen kein C_γ) gibt es zudem eine enge Beziehung zwischen der Besetzung dieser Rotamere und den Torsionswinkeln der Hauptkette [199]. In größeren Aminosäuren ist deshalb *gauche*⁻ (*g*⁻) auf Grund ungünstiger sterischer (z. B. Leu, Abbildung 54) und elektrostatischer Wechselwirkung (z. B. kurze polare Aminosäuren, a, b) zwischen der Seitenkette und dem $>C=O$ der Hauptkette kaum besetzt.

Abbildung 34: Die Nomenklatur der Seitenkettenrotamere

2.5.2 Gegabelte Wasserstoffbrückenbindungen

Das Dielektrikum „Membran“ verstärkt elektrostatische Wechselwirkungen [200] (Tabelle 1). Für die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen wurde deshalb generell ein Wechselwirkungs- Cut Off von 3,0 Å festgelegt. Der im Vergleich zu früheren Arbeiten [201, 202] gemäßigte Cut Off schließt v. a. die schwächeren H-Brücken i, i+3, typisch für 3_{10} -Helices verstärkt in diese Analyse mit ein. Zusammen mit den für α -Helices typischen i, i+4 H-Brücken erhalten deshalb gegabelte Hauptkettenwasserstoffbrücken in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung [203].

2.5.3 Definition der Sekundärstrukturelemente

Die Sekundärstrukturen der untersuchten Membranproteine (Tabelle 3, Tabelle 10) und der Referenzgruppe globulärer Proteine wurden zunächst mit Hilfe des DSSP Kriteriums von [177] definiert. Bewertungsgrundlage dieses Algorithmus sind Torsionswinkel und Hauptkettenwasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken). Strukturelle Besonderheiten der helikalen TM-Abschnitte wie Knicke und π -Bulges, bzw. die Motive an den Helixenden (Helixcaps) werden dabei als nicht α -helikal bzw. Turns bewertet (Abbildung 58).

Für die Analyse der Torsionswinkel, welche in dieser Arbeit auch zur Beurteilung der Qualität der Strukturdaten dient, wurden deshalb ausschließlich α -helikale Abschnitte untersucht (DSSP). Um die geometrischen Besonderheiten in Membranproteinen erstmalig zu quantifizieren, wurde die Analyse der H-Brücken für alle Aminosäurereste der TM-Abschnitte durchgeführt. Als TM-Abschnitte wurden die durch die Membrangrenzen verkürzten Helices gemäß den Angaben in den *sco*-files definiert (Abbildung 32).

2.5.4 Statistische Bewertung der Ergebnisse

Nach Überprüfung der Gleichverteilung wurden die Unterschiede zwischen den beiden Datensätzen mit Hilfe probater Signifikanztests evaluiert [178]. Die Besetzung der Seitenkettenrotamere bei TM-Helices und Helices globulärer Proteine wurde mittels des χ^2 -Tests statistisch bewertet (Formel 7). Verglichen wird die prozentuale Besetzung eines Seitenkettenrotamers (g^+ , g^- und t) einer Aminosäure im Datensatz der TM-Helices (R_i) und langer Helices globulärer Proteine (S_i). Der χ^2 -Test summiert die Differenz dieser drei relativen Verteilungen (Formel 8):

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(R_i - S_i)^2}{R_i + S_i} \quad \text{Formel 7}$$

$$\sum_i R_i = \sum_i S_i = 100 \quad \text{Formel 8}$$

Die Anzahl der Freiheitsgrade ist demnach $N_B - 1 = 2$ (N_B =Anzahl der möglichen Zustände hier g^+ , g^- und t). Mit $q=0,95$ ist für einen Wert $\chi^2 \geq 6$ der Unterschied zwischen den beiden verglichenen Datensätzen signifikant. Als absolute Mindestanzahl pro Seitenkettenrotamer wurde außerdem R_i und $S_i \geq 5$ festgelegt.

Divergenzen beim Vergleich der mittleren Hauptkettenwinkel und der durchschnittlichen Wasserstoffbrückenbindungslänge von TM-Helices (\bar{x}') und langen Helices globulärer Proteine (\bar{x}'') wurden mit dem Doppelten T-Test (Student-Test) beurteilt (Formel 9). Der Student-Test findet seine Anwendung für gleichverteilte Stichproben mit bekannter Streuung (σ' , σ'' = Varianz des jeweiligen Datensatzes) und unterschiedlicher Größe (n' , n'' = Anzahl des jeweiligen Datensatzes). Für den Wert $t \geq 1,960$, bzw. $t \geq 2,576$ sind die Unterschiede der verglichenen Datensätze mit einer Sicherheit von 95 %, bzw. 99 % signifikant.

$$t = (\bar{x}' - \bar{x}'') \frac{\sqrt{\frac{n' * n''}{n' + n''}}}{\sqrt{\frac{\sigma'^2 * (n' - 1) + \sigma''^2 * (n'' - 1)}{n' + n'' - 2}}} \quad \text{Formel 9}$$

2.6 Datenverarbeitung und graphische Darstellung

Die Bestimmung der Haupt- und Seitenkettenwinkel und der Abstände zwischen >N-H (die Wasserstoffe wurden modelliert) und dem >C=O für die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungsängen erfolgte mit InsightII. Die Analyse und Bewertung der Daten erfolgte in Excel 2002. Zu diesem Zweck wurden ein Großteil der Arbeitsschritte (z. B. Auswahl der TM-Abschnitte, Bestimmung von Sequenznachbarn, usw.) m. H. von VBA automatisiert. Die Molekülabbildungen wurden im WebLab-Viewer Pro 4.0 erstellt und in Power Point 2002 bzw. Photoshop 6.0 überarbeitet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Die Helixcaps

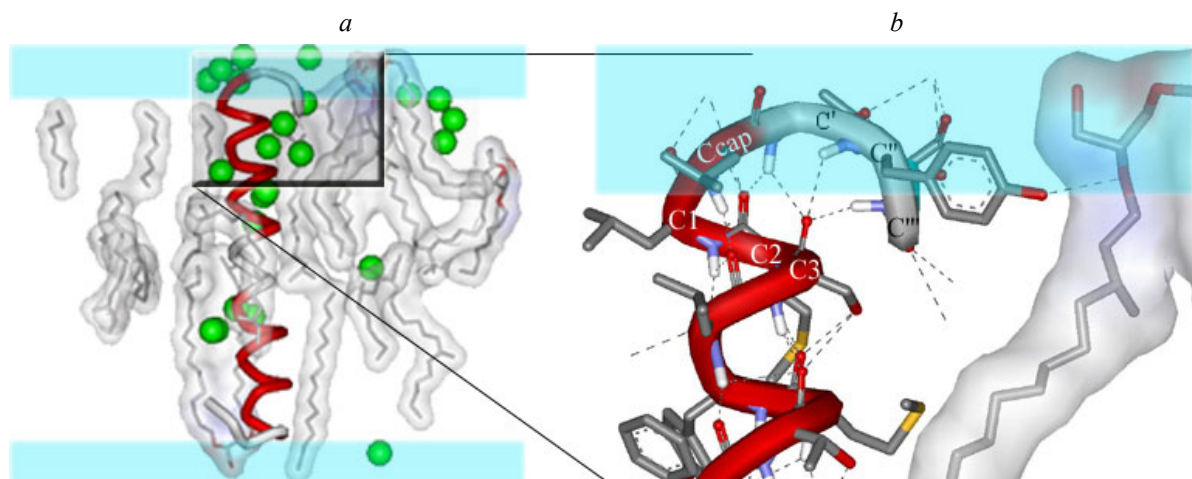
3.1.1 Ergebnisse

3.1.1.1 Nachweis von Helixcaps beim Bakteriorhodopsin

Systematische Untersuchungen zum Vorkommen bzw. zur Zusammensetzung der Helixcaps von Membranproteinen gibt es bisher keine. Die Analyse der Wechselwirkungen, die diesen Strukturmotiven zugrunde liegen, erfordert die exakte Bestimmung der Distanz zwischen Atomen der Haupt- und der Seitenkette (auch ab der δ -Position). Diese Messungen sind aber frühestens ab einer Auflösung von 2 Å möglich. Seit 1999 existiert allerdings eine Struktur vom Bakteriorhodopsin mit atomarer Auflösung, welche dieses Kriterium erfüllt und daneben eine Vielzahl von Wassermolekülen enthält [39]. Die Helixenden und Turns dieser Struktur wurden deshalb untersucht und genau charakterisiert.

Die typischen hydrophilen Wechselwirkungen eines Schellmann Motivs ($6 \rightarrow 1$, $5 \rightarrow 2$) sind zwischen dem $>\text{N-H}$ am C' und dem $>\text{C=O}$ am C3 bzw. zwischen dem $>\text{N-H}$ am C' und dem $>\text{C=O}$ am C2 (Abbildung 35). Dieses an C-terminalen Helixenden globulärer Proteine häufige Motiv ist durch hydrophobe Wechselwirkungen ($6 \rightarrow 1$) zwischen der Seitenkette von C' und C3 gekennzeichnet. Die Positionierung der Helixcaps im Interface zwischen dem hydrophoben Membranmilieu und den hydrophilen Lipidköpfchen führt aber zur Bevorzugung der stärkeren hydrophilen Wechselwirkungen mit den polaren Lipidköpfchen (z. B. Tyr in C' , C-Terminus Helix 2).

Abbildung 35: Helix 2 von Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w):



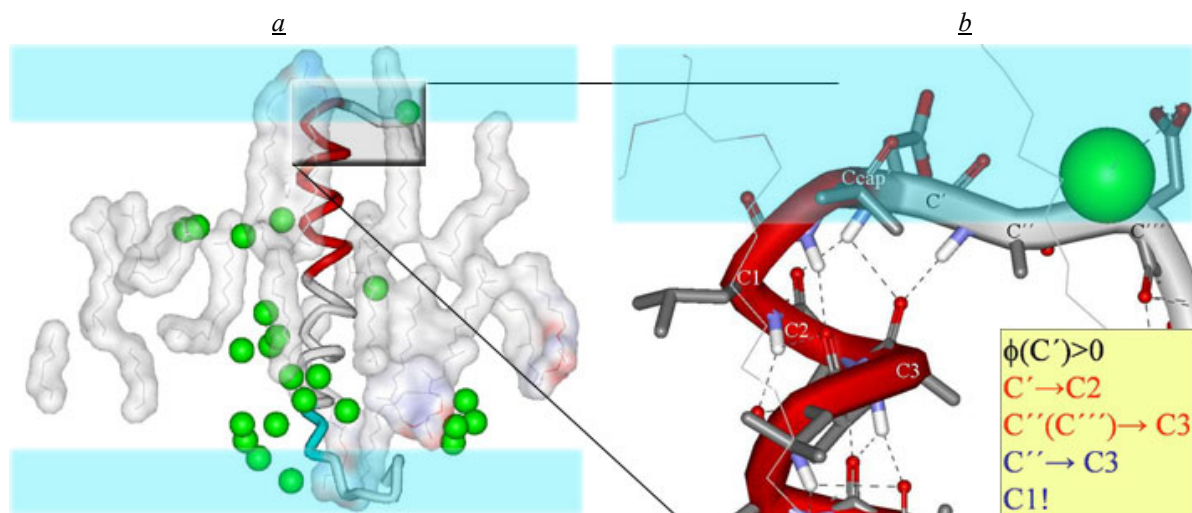
a) Positionierung der Helix in der Lipiddoppelschicht. Die Helixenden liegen im Bereich der polaren Lipidköpfchen (hellblauer Abschnitt). **b)** C-Terminus (Schellmann Motiv) vergrößert mit benachbarten Lipiden (mit Oberfläche): Die Helix endet mit Leu 62 und der nachfolgende Rest Gly 63 besitzt einen positiven ϕ -Winkel. Die H-Brücken $\text{C}' \rightarrow \text{C3}$ und $\text{C}' \rightarrow \text{C2}$ sind typisch für das Schellmann Motiv. Grund für die fehlenden hydrophoben Wechselwirkungen ($\text{C}' \rightarrow \text{C3}$) in diesem Cap könnte die Positionierung im Interface zwischen Membran und Wasser sein. Aus dem gleichen Grund ist in C1 eine hydrophobe Aminosäure zu finden (s. fortlaufender Text).

Die $>C=O$ Gruppen von Helix 2 sind in (Abbildung 35) ab Aminosäure C1 (Leu 61) innerhalb der polaren Köpfchen positioniert, die Seitenkette von C1 liegt aber noch innerhalb der Membran. Optisch beschreibt der Tyrosinring von C'' (Tyr 64) zusammen mit der $>C=O$ Gruppe von C1 (Leu 61) eine Ebene die von den dazwischen liegenden Resten umspannt wird. Deren $>C=O$ ragen dabei wie die „Stacheln eines Igels“ in das polare Medium, während die Aminogruppen durch ein Geflecht aus H-Brücken das Konstrukt der C-Kappe, also den „Bauch des Igels bilden“ (Abbildung 35).

In den Helixcap Motiven wasserlöslicher globulärer Proteine weisen bestimmte Aminosäureseitenketten immer nach Außen, in Richtung der polaren Proteinumgebung. Die C1 bzw. C2 Position in dem Schellmann Motiv ist daher immer, bzw. sehr häufig mit einer der polaren Aminosäuren besetzt [174, 204]. Das Löslichkeitsverhalten der in diesen Positionen exponierten Reste (Tabelle 1) könnte somit auch einen Hinweis zur genauen Lage des Caps im hydrophoben oder im hydrophilen Milieu geben.

Die C1 Position am Ccap von Helix 2, 3 bzw. 6 sind Bestandteil eines derartigen Schellmann Motivs, bzw. eines „long range“ Schellmann Motivs. Alle drei C1 Positionen sind mit Leu besetzt. In den C2 Positionen befinden sich mit Met, Leu bzw. Trp (Die >N-H Gruppe des Indolrings ist in Kontakt mit einem Kanal-H₂O) ebenfalls hydrophobe Reste. Die relative Lage dieser Reste zu den Lipiden (Abbildung 35, Abbildung 36) belegt: Die genannten C1 und C2 Positionen liegen sämtlich innerhalb des hydrophoben Bereichs der Membran.

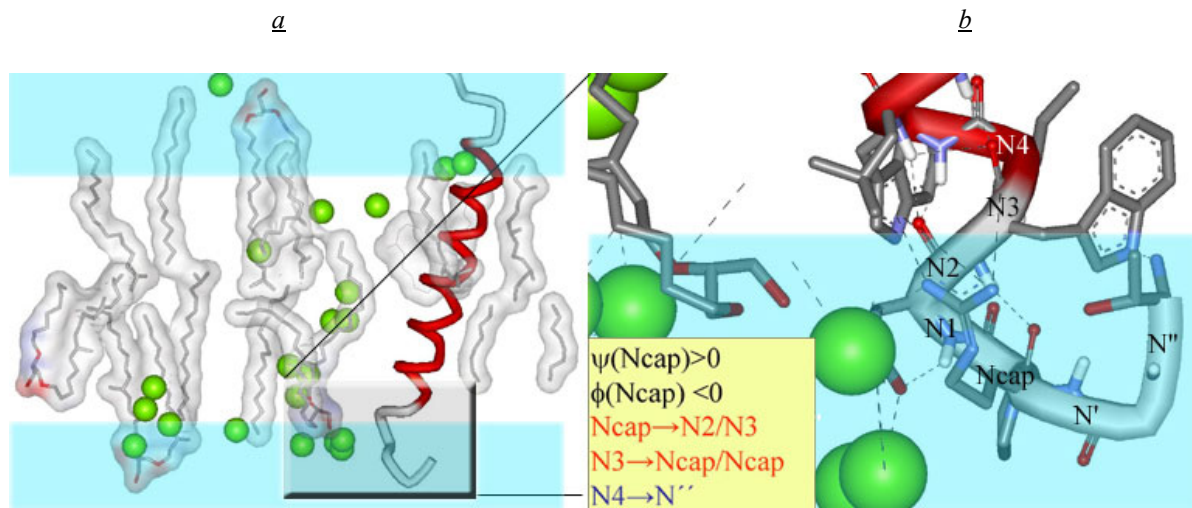
Abbildung 36: Helix 3 von Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w)



a) Positionierung der Helix in der Lipiddoppelschicht. Die Helixenden ragen in den Bereich der polaren Lipidköpfchen (transparentes Blau). Der N-Terminus ist durch Kontakt mit dem Kanalwasser (grün) aufgelockert und nicht α -helikal. **b)** C-Terminus vergrößert mit benachbarten Lipiden (als dünne Linien): Typisch für das Schellmannmotiv sind die polaren H-Brücken (Cut off 3 Å) von 6→1, 5 (6) →2 (rote Bezeichnung in gelben Kasten) und das hydrophobe Capping (blaue Bezeichnung) zwischen C3 (Ala 98) und C'' (Ala 103). In C1-Position (Leu 100) befindet sich ungewöhnlich für ein „klassisches Schellmannmotiv“ ein unpolarer Rest. Sein Carbonyl Sauerstoff weist nach außen in das wässrige Milieu und bildet zusammen mit C'' (Asp 102), C^{4'} (Asp 104) und dem Wasser 2074 (grüne Kugel) eine Ebene. In dieser Ebene verläuft die Grenzfläche zwischen dem hydrophoben Bereich der Membran und den polaren Lipidköpfchen.

Der N-Terminus (Helix 1, Abbildung 37) liefert ein weiteres Beispiel für eine Supersekundärstruktur, deren Stabilität durch die Membrenumgebung bestimmt wird. Die H-Brücken zwischen Arg 7 und Glu 9 bzw. Trp 10 (Ncap→N2/N3) sind typisch für eine „Capping Box“. Das hydrophobe Capping zwischen N'' (außerhalb) und N4 (innerhalb der Membran) fehlt allerdings. Alternativ gibt es aber eine polare Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus (Thr 5, N') und Trp 10 (N3), welche wie diejenigen von Trp 12 (N5) und Arg 7 (Ncap) außerhalb der Membran liegen.

Abbildung 37: Der N-Terminus von Bakteriorhodopsin (N-Cap) (1c3w)



a) Positionierung der Helix in der Lipiddoppelschicht. Die Helix endet im Bereich der polaren Lipidköpfchen (hellblauer Abschnitt).

b) N-Terminus („Capping Box“) vergrößert mit benachbarten Lipiden und Wasser (grüne Kugeln). In dem gelben Kästchen sind die für dieses Motiv typischen hydrophilen (rot) und hydrophoben (blau) Wechselwirkungen angegeben.

3.1.1.2 Aminosäurepräferenzen in den Helixcaps von Membranproteinen

In Tabelle 6 und Tabelle 7 werden die Aminosäurepräferenzen aller Cap Positionen (Abbildung 27) in den TM-Helices/Turns („Transmembran Helices“) und den EM-Helices/Turns („Extramembran Helices“, Helices im globulären wasserlöslichen Anteil von Membranproteinen) vergleichend gegenübergestellt. Neben den lokalen Aminosäurepräferenzen am C, oder am N-Terminus, ist der Vergleich zwischen den membranständigen Helices mit den Helices der wasserlöslichen Membranproteinanteile von besonderem Interesse. Daher wurden bei dieser Analyse nicht zwischen intra-, und extrazellulären Proteinabschnitten unterschieden.

Der Wert eins bedeutet keine Präferenz an der betreffenden Position, eine Zahl größer als eins steht für die lokale Bevorzugung einer Aminosäure im Vergleich zum Durchschnittsvorkommen im gesamten Protein. Ein Wert kleiner als eins besagt, dass die betreffende Aminosäure vergleichsweise selten in dieser Position zu finden ist. *Kursiv* bzw. **fett** gedruckte Zahlen kennzeichnen den jeweiligen *auffälligen* bzw. **signifikant höheren** Wert beim Vergleich der beiden Datensätze (farbig hervorgehoben).

Tabelle 6: Aminosäurepräferenzen für die verschiedenen N-Cap Positionen von Turn-Helix Motiven

	N''''	N'''	N''	N'	Ncap	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅
Ala	0,4/0,8	0,3/0,6	0,8/0,6	0,0/0,1	0,2/0,1	0,6/1,0	1,0/0,7	1,2/1,2	0,6/1,8	0,6/2,3
Arg	1,3/1,0	0,4/0	0,7/0,8	0,7/0,1	1,3/0,2	0,7/0,6	0,7/1,0	1,5/1,2	0,9/0,6	0,2/0,6
Asn	1,1/0,9	0,8/0,9	1,6/0,5	3,8/1,5	1,4/0,5	0,0/0,0	0,3/0,7	0,8/1,2	1,1/0,7	0,0/0,0
Asp	0,7/0,4	1,6/1,0	0,9/0,4	1,8/2,2	1,4/1,0	1,4/0,5	0,9/0,8	0,2/0,2	0,2/1,8	0,2/0,0
Cys	0,0/0,0	0,0/0,0	0,8/1,3	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,7	0,0/1,3	3,8/0,7	0,8/0,0
Gln	0,7/1,6	0,7/1,6	0,0/0,0	0,4/1,3	0,0/0,0	1,1/2,0	0,0/0,7	2,2/1,0	1,1/0,7	0,4/1,0
Glu	0,6/0,8	0,6/0,3	0,2/1,3	0,4/1,0	1,3/2,0	1,3/1,3	1,3/1,8	0,8/0,8	0,6/0,5	0,0/0,7
Gly	1,0/0,2	1,9/1,4	0,7/1,0	0,7/0,9	0,4/0,7	0,2/0,3	1,0/0,5	1,0/0,8	0,5/0,7	0,7/0,4
His	0,3/0,6	1,0/1,5	2,4/0,6	1,0/0,9	0,7/0,3	0,3/0,3	0,3/0,3	0,0/0,3	0,0/0,0	0,7/0,6
Ile	1,2/0,5	0,3/0,3	1,2/1,0	0,9/0,1	0,3/0,5	0,6/0,8	0,4/0,7	0,7/0,4	1,8/0,5	1,5/0,7
Leu	0,9/0,4	0,5/0,7	0,9/0,4	0,2/0,3	0,8/0,3	0,9/0,4	1,4/0,5	0,4/0,5	1,0/0,5	0,9/0,6
Lys	0,0/1,7	0,9/0,6	0,2/0,0	0,7/0,2	0,9/0,6	0,9/1,1	0,2/0,6	0,9/0,9	0,7/1,1	0,7/1,3
Met	1,3/0,5	0,9/1,1	0,3/0,5	0,9/0,5	0,3/0,0	0,3/0,3	0,9/1,1	1,3/1,1	0,6/0,3	0,3/0,5
Phe	0,5/0,6	0,7/0,4	0,7/1,1	0,9/0,4	0,3/0,8	0,7/0,5	0,2/0,3	0,3/0,3	0,2/0,3	0,7/0,3
Pro	0,8/1,1	2,4/1,0	0,6/1,1	0,8/0,8	2,6/1,5	1,9/1,3	0,4/1,3	0,0/0,0	0,0/0,5	0,8/0,0
Ser	1,5/1,2	0,3/0,8	1,1/0,4	1,1/0,9	0,3/0,1	0,9/0,7	0,8/0,4	0,9/0,3	0,3/0,8	0,3/0,1
Thr	0,4/0,5	0,3/0,6	1,0/0,6	1,4/1,3	0,4/0,6	0,3/0,3	1,3/0,3	1,0/0,6	0,4/0,1	0,7/1,4
Trp	0,0/0,0	0,0/0,0	0,7/0,3	1,4/0,1	0,7/1,5	2,8/1,2	1,8/1,8	2,5/0,3	0,4/1,5	1,1/2,2
Tyr	1,6/0,5	0,3/0,2	0,3/0,2	0,5/0,0	0,8/1,6	0,8/0,5	1,0/0,5	1,0/0,9	0,3/0,2	0,8/0,7
Val	0,1/0,3	0,7/0,4	0,8/0,3	0,2/0,5	1,5/0,2	0,2/0,4	0,9/0,4	0,3/0,6	1,0/1,0	1,0/0,6

präferenz in
TM – Helices
/ präferenz in
EM – Helices

Fett = signifikant höherer Wert (Signifikanzniveau $\alpha_{0,975}$)
Kursiv = „auffällig“ hoher Wert (Signifikanzniveau $\alpha_{0,90}$)
(gelb in TM-Helices, blau in EM-Helices)

Tabelle 7: Aminosäurepräferenzen in den verschiedenen C-Cap Positionen von Helix-Turn Motiven

	C ₅	C ₄	C ₃	C ₂	C ₁	Ccap	C'	C''	C'''	C''''
Ala	0,4/ _{0,6}	0,8/ _{2,3}	1,4/ _{1,3}	1,5/ _{0,6}	1,0/ _{1,4}	1,0/ _{1,0}	0,4/ _{0,8}	0,2/ _{0,8}	1,5/ _{0,4}	0,2/ _{0,5}
Arg	0,2/ _{0,4}	0,2/ _{0,8}	0,9/ _{1,4}	0,2/ _{1,5}	0,2/ _{1,0}	0,2/ _{1,0}	1,3/ _{0,4}	0,7/ _{0,2}	0,4/ _{1,5}	0,2/ _{0,2}
Asn	0,3/ _{0,0}	0,0/ _{0,5}	0,3/ _{0,2}	0,3/ _{0,5}	0,0/ _{0,0}	0,5/ _{1,4}	1,1/ _{0,9}	0,5/ _{0,9}	0,5/ _{0,2}	2,4/ _{0,9}
Asp	0,5/ _{0,6}	0,0/ _{0,8}	1,2/ _{0,0}	0,0/ _{0,4}	0,0/ _{0,2}	0,5/ _{0,6}	0,9/ _{0,1}	0,2/ _{1,4}	0,7/ _{1,0}	0,2/ _{1,0}
Cys	2,3/ _{3,3}	0,0/ _{0,0}	0,0/ _{2,1}	0,0/ _{1,3}	0,0/ _{0,7}	0,0/ _{0,7}	0,8/ _{0,0}	0,0/ _{0,0}	0,0/ _{0,7}	0,0/ _{0,7}
Gln	0,7/ _{2,1}	0,0/ _{0,0}	0,0/ _{0,0}	0,0/ _{0,3}	0,7/ _{1,3}	0,4/ _{0,3}	0,4/ _{0,0}	0,7/ _{0,7}	0,0/ _{0,1}	0,7/ _{0,0}
Glu	0,0/ _{0,5}	0,6/ _{0,7}	0,8/ _{2,0}	0,4/ _{0,3}	0,4/ _{0,8}	1,2/ _{0,7}	0,2/ _{0,8}	1,0/ _{0,2}	0,8/ _{1,3}	0,8/ _{0,5}
Gly	0,2/ _{0,0}	0,5/ _{0,3}	0,7/ _{0,1}	0,0/ _{0,1}	0,4/ _{0,2}	0,9/ _{0,5}	1,4/ _{1,5}	1,6/ _{0,8}	1,7/ _{1,1}	0,9/ _{0,4}
His	1,7/ _{0,6}	0,7/ _{0,9}	0,3/ _{0,3}	0,7/ _{0,3}	1,0/ _{0,6}	0,0/ _{0,3}	1,7/ _{1,5}	0,3/ _{0,0}	0,7/ _{0,9}	1,0/ _{0,6}
Ile	1,0/ _{0,7}	1,0/ _{0,9}	0,9/ _{0,4}	0,4/ _{0,1}	1,2/ _{0,3}	1,3/ _{0,4}	0,6/ _{0,4}	0,1/ _{1,3}	0,4/ _{0,4}	0,7/ _{0,4}
Leu	1,4/ _{0,7}	1,2/ _{0,6}	0,9/ _{0,7}	2,4/ _{1,1}	1,3/ _{1,0}	1,5/ _{0,7}	0,3/ _{0,3}	0,3/ _{0,1}	1,2/ _{0,2}	0,6/ _{0,2}
Lys	0,2/ _{0,0}	0,0/ _{0,8}	0,2/ _{1,7}	0,9/ _{1,1}	0,9/ _{0,6}	0,2/ _{0,5}	2,0/ _{1,9}	0,9/ _{1,9}	0,9/ _{0,6}	1,1/ _{0,9}
Met	0,3/ _{0,5}	1,6/ _{1,1}	0,6/ _{0,5}	0,0/ _{0,8}	0,9/ _{1,9}	1,3/ _{0,5}	0,9/ _{1,6}	0,0/ _{0,3}	1,3/ _{0,5}	0,0/ _{0,8}
Phe	2,4/ _{0,3}	1,2/ _{0,9}	1,0/ _{0,8}	0,7/ _{0,3}	1,6/ _{0,8}	0,5/ _{0,5}	0,9/ _{0,8}	1,2/ _{0,3}	0,5/ _{0,6}	0,8/ _{2,1}
Pro	0,0/ _{0,3}	0,2/ _{0,0}	0,6/ _{0,5}	0,2/ _{0,0}	0,0/ _{0,0}	0,0/ _{0,0}	0,4/ _{0,0}	3,4/ _{1,1}	0,8/ _{0,7}	2,8/ _{1,0}
Ser	0,2/ _{0,8}	0,3/ _{0,1}	0,3/ _{0,1}	1,5/ _{0,9}	0,8/ _{0,4}	1,1/ _{1,1}	0,6/ _{0,1}	0,8/ _{0,8}	0,8/ _{0,8}	0,5/ _{0,7}
Thr	1,6/ _{1,0}	1,0/ _{0,5}	0,3/ _{0,8}	0,1/ _{0,5}	0,9/ _{0,5}	0,9/ _{1,5}	0,9/ _{0,6}	0,3/ _{0,4}	0,6/ _{0,4}	0,7/ _{0,8}
Trp	0,7/ _{1,2}	1,1/ _{0,6}	2,1/ _{0,6}	2,5/ _{0,3}	0,4/ _{0,6}	1,4/ _{0,0}	1,4/ _{0,0}	0,7/ _{0,3}	2,5/ _{1,5}	0,4/ _{0,3}
Tyr	0,8/ _{0,2}	1,3/ _{0,5}	0,3/ _{1,1}	2,6/ _{1,8}	1,3/ _{0,7}	1,0/ _{0,5}	0,3/ _{1,1}	1,0/ _{0,7}	0,8/ _{0,0}	0,0/ _{0,9}
Val	1,3/ _{0,8}	0,6/ _{1,9}	1,9/ _{0,1}	1,0/ _{0,3}	0,9/ _{0,3}	0,2/ _{0,0}	0,8/ _{0,4}	0,9/ _{0,6}	0,7/ _{0,4}	0,1/ _{0,6}

präferenz in
TM – Helices

präferenz in
EM – Helices

Fett = signifikant höherer Wert (Signifikanzniveau $\alpha_{0,975}$)
Kursiv = „auffällig“ hoher Wert (Signifikanzniveau $\alpha_{0,90}$)
 (gelb in TM-Helices, blau in EM-Helices)

Aromatische Aminosäuren

Die Aromaten sind besonders häufig im Bereich der TM-Helixcaps zu finden. Signifikant höher als im Datensatz der EM-Helices ist das Auftreten von Trp in N3, N', C2, Ccap und C'-Position, bzw. von Phe in C5, C1 und C''. Trp kommt am N-Terminus, Phe und Tyr am C-Terminus häufiger in Positionen innerhalb der TM-Helix vor.

Positiv geladene Aminosäuren

Arg und Lys sind am C-Terminus der TM-Helices nur in C'-Position auffällig häufig vertreten, kommen aber in C2 und C''' (Arg) bzw. C3 und C4 (Lys) signifikant häufiger bei EM-Helices vor. Arg ist am N-Terminus von TM-Helices in Ncap und N', His in N'' signifikant häufiger vertreten. Die positiv geladenen Aminosäuren sind am N-Terminus insgesamt häufiger, zeigen aber keine deutliche Präferenz für eine Position innerhalb, bzw. außerhalb der TM-Helix.

Glu, Gln und Asp, Asn

Asn, Asp sind am N-Terminus bevorzugt als Cap, bzw. in Positionen außerhalb, Glu und Gln dort aber innerhalb der TM-Helix zu finden. Im Vergleich mit den entsprechenden Positionen der EM-Helices ist Asp bei N4 und Glu bei (N5, bzw.) N'' signifikant seltener belegt. Am C-Terminus ist Asp signifikant häufiger in C3 (und seltener in C4), Glu häufiger in Ccap und C'' (und seltener in C') von TM-Helices zu finden. Diese Aminosäuren sind am C-Terminus insgesamt seltener in Positionen innerhalb der TM-Helix zu finden.

Ser, Thr

Signifikant ist die Häufung von Ser in N3 und Thr in N2 Position von TM-Helices. In diesem Datensatz werden außerdem N''', C2 (Ser) und N', C5 (Thr) bevorzugt besetzt. Insgesamt gibt es aber keine Bevorzugung von Positionen innerhalb oder außerhalb der Helix.

Pro, Gly

Pro ist sowohl am N-, als auch am C-Terminus signifikant häufiger in Positionen außerhalb von TM-Helices zu finden (N''', C'' und C'''). Auffällig sind aber auch die deutliche Präferenz dieser Aminosäure für die Anfangsposition in TM-Helices (Ncap) und der jeweils niedrigere Wert in N2 und N4. Gly zeigt diese Tendenz ebenfalls, aber in etwas abgeschwächter Form (an N'''' signifikant, an C'' auffällig häufiger). Eine Ausnahme ist die C3 Position, welche von dieser Aminosäure in TM-Helices signifikant öfter belegt ist.

Hydrophobe Aminosäuren

Ala kommt in beiden Datensätzen häufiger in Positionen innerhalb der Helix vor, signifikant ist aber die geringe Präferenz in N4, N5 und C4 in TM-Helices. Leu, Val und Ile sind C-Terminal häufiger in Positionen innerhalb von TM-Helices zu finden (signifikant: Leu: C2, Ccap, C'''; Ile: C1, Ccap; Val: C2, C3). Diese Tendenz trifft auch auf den N-Terminus zu. Dort sind aber neben dem Ncap (Leu, Val) und N2 (Leu) auch Positionen außerhalb der TM-Helix (N' bei Ile und N'' bei Val) signifikant stärker vertreten.

3.1.2 Diskussion

3.1.2.1 Aminosäurepräferenzen in den Helixcaps von Membranproteinen

Aromatische Aminosäuren

Die Aromatische Aminosäuren Trp, Tyr, Phe besitzen (neben Gly und Pro) die insgesamt stärksten Präferenzen für eine Position im Übergangsbereich vom hydrophilen zum hydrophoben Milieu der Membran (im folgenden Membran Interface genannt). Trp und Tyr sind die Aminosäuren mit dem stärksten amphiphilen Charakter [135] und dienen daher als „Bojen“ auf der Cis-, bzw. auf der Transseite der Membran [136, 205] (Abbildung 47).

Phe kann im Bereich der Lipidköpfchen ebenfalls eine solche Ankerfunktion erfüllen [206, 207] wird aber auf Grund seines hydrophoben Charakters v. a. häufig im Zentrum der Membran gefunden [183] (Abbildung 5, Tabelle 11). Die höchsten Präferenzwerte (2,5-2,8) wurden dementsprechend für Trp (N1, N3, C2, C'') und Tyr (C2) im unmittelbaren Bereich der Helixenden gefunden. Phe besitzt bei C5 sein höchstes Vorkommen, eine Position die erfahrungsgemäß im hydrophoben Bereich der Membran liegen dürfte (Kapitel 3.2.1).

Positiv geladene Aminosäuren

Arg und Lys werden ähnlich wie die aromatischen Aminosäuren in einer Position im Bereich der TM-Helixenden erwartet. Beide Aminosäuren besitzen neben der positiv geladenen Amine- bzw. Guanidiniumgruppe lange aliphatische Reste, welche sich gut im hydrophoben Bereich der Membran lösen [3]. Die positiv geladenen Köpfchen ragen dann in den Bereich der Lipidköpfchen und der negativ geladenen Phosphatgruppen [208] (Abbildung 38).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung geben aber keinen Hinweis auf diesen bei Modellsystemen häufig als „Snorkel Effect“ beschriebenen Mechanismus [209], obwohl einzelne Beispiele gefunden werden können (Abbildung 38). Auffällige, bzw. signifikante Präferenzen gegenüber der Besetzung der Aminosäurepositionen in den EM-Helices sind (außer Arg in N3) bei Arg, Lys und His erst ab dem Cap, also nach Ende der TM-Helix zu finden. Arg und Lys sind zudem viel häufiger an den N-Caps von TM-Helices zu finden. Dies könnte auch ein direkter Hinweis für die Signalfunktionen dieser Aminosäuren während der Biosynthese sein (Kapitel 1.3.2) [137].

Glu, Gln und Asp, Asn

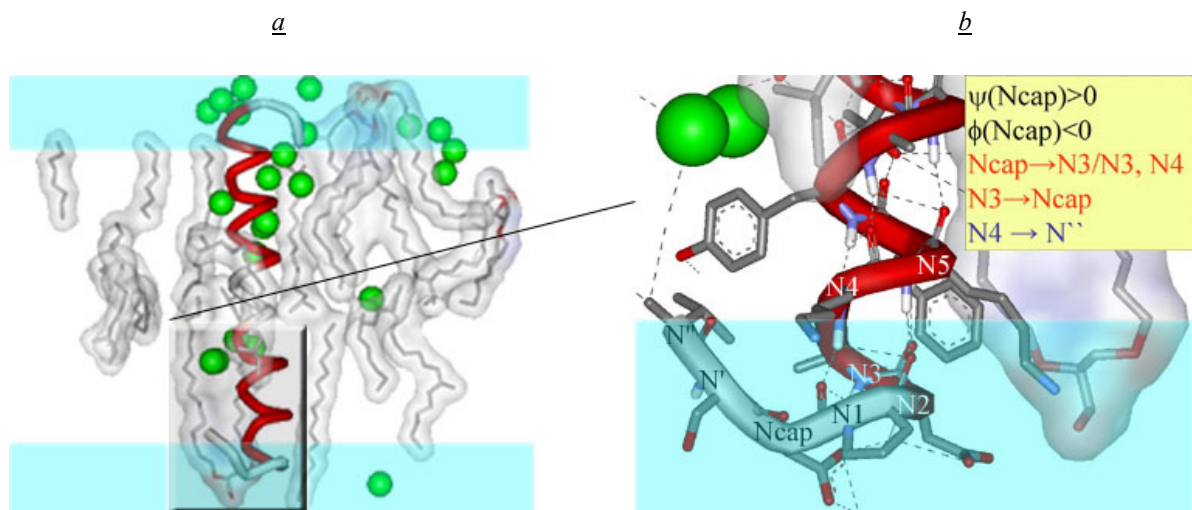
Der „Schnorchel Effekt“ gilt auf Grund der Abstoßung durch die Phosphatgruppen und der ohnehin kurzen Seitenketten nicht für die Aminosäuren mit negativ geladenen Seitenketten [209]. Diese ohnehin selten in Membranproteindomänen zu findenden Reste besitzen deshalb meistens spezifische Funktionen, wie die Bindung von prosthetischen Gruppen, oder die Ausformung von Kanälen. Trotzdem treten Asp (C3; Präferenz: 1,2), bzw. Gln (N3; 2,2) bevorzugt in einigen Helixcap Positionen auf.

Hydrophobizitätsskalen weisen diesen Aminosäuren einen eindeutig hydrophilen Charakter zu. Die experimentell bestimmten Aminosäurepräferenzen für das Membraninterface sprechen aber für die Positionierung von Asp in diesem Bereich [83]. Der Transfer von Glu⁰ (ungeladen), den aromatischen und sogar einigen hydrophoben Aminosäuren vom wässrigen in den Interfacebereich ist demnach ebenfalls gewinnbringend. Ein aus der zugänglichen Moleküloberfläche (Accessible Surface Area) und der Länge des hydrophoben Seitenkettenanteils errechneter Amphiphilizitäts Index [135], gibt für Gln (ebenso Glu) einen gemäßigten amphiphilen Charakter an (1,3). Einen positiven Wert besitzen in dieser Skala sonst nur noch: His (1,5), Arg (2,5), Lys (3,7), Tyr (5,1) und Trp (6,9).

Ser, Thr

Ser und Thr weisen entsprechend der Einordnung der in dieser Arbeit verwendeten Hydrophobizitätsskalen (Tabelle 8) und Amphilizitätsindices (Betrag jeweils 0) keine eindeutige Bevorzugung eines bestimmten Umgebungsmilieus auf. Im Bereich der Helixcaps sind entsprechend dieser Einordnung sowohl die Positionen innerhalb der TM-Helices, als auch in den Turns gleichermaßen besetzt. In TM-Helices sind Thr und Ser signifikant häufiger in den Position N3 (zusammen mit Gln und Trp) und N2 (mit Glu, Trp und Leu) zu finden. Am C-terminalen Ende wird Ser dort bevorzugt in C2 Position gefunden. Sehr häufig sind an dieser Stelle aber v. a. Leu und Trp.

Abbildung 38: Helix 2 von Bakteriorhodopsin (N-Cap) (1c3w)



a) Positionierung der Helix in der Lipiddoppelschicht. Die Helixenden liegen im Bereich der polaren Lipidköpfchen (hellblauer Abschnitt).

b) N-Terminus (Big Box) vergrößert mit benachbarten Lipiden: Ser (N') und Asp (N2, N-Cap) liegen im hydrophilen Milieu. Die beiden Lys (N4, N5) befinden sich im hydrophoben Membranbereich, schnorcheln aber in das wässrige Milieu. Dieses Cap ist ein Beispiel dafür, dass auch relativ weit vom Cap entfernte Positionen (Phe: N6) noch bis in den polaren Bereich ragen können. Somit werden wie in allen hier untersuchten Helixcaps, im hydrophoben Membranmilieu alle potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen (schwarz, gestrichelt) tatsächlich gebildet.

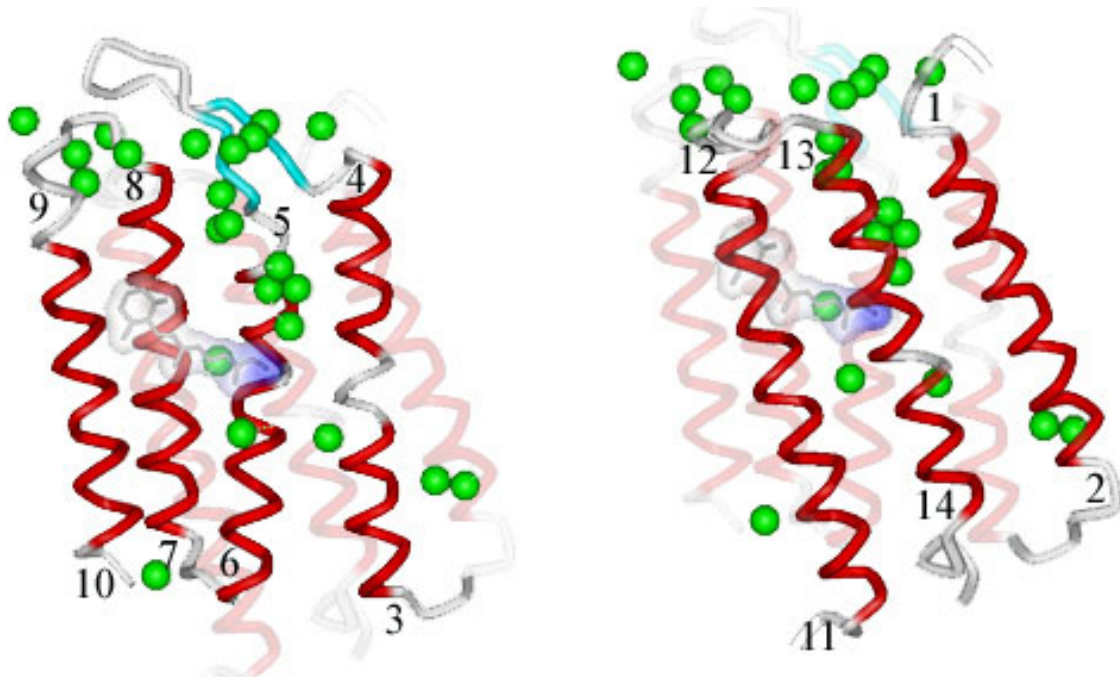
Pro und Gly

Pro besitzt die stärksten Präferenzen für eine Position im Turnbereich von TM-Domänen (C'' , Präferenz. 3,4; C''' , 2,8; N''' , 2,4). Nur Trp weist dort eine ähnlich starke Bevorzugung auf (C''' , 2,5). Beide Aminosäuren sind in den Helixcaps von TM-Helices mehr als doppelt so stark vertreten, wie von EM-Helices. Der Vergleich mit den Aminosäurepräferenzen an den Helixcaps von globulären wasserlöslichen Proteinen [173] betont ebenfalls die deutliche Bevorzugung dieser Aminosäuren in den TM-Domänen.

Ein Grund für das häufige Auftreten von Pro im Zentrum von TM-Helices ist wahrscheinlich die Destabilisierung von β -Faltblättern während der Faltung [210] (s. a. Abbildung 45). Die hier aufgeführten Ergebnisse geben erstmals einen direkten Hinweis darauf, dass diese Regel ebenso eine Gültigkeit für die Turns von TM-Domänen besitzen kann. Dafür spricht auch die starke Betonung von Pro als erste Aminosäure der TM-Helix.

Die diskrete Verteilung von Pro auf bestimmte Cap Positionen verweist ansonsten einerseits auf die Genauigkeit dieser Analyse, andererseits auf das häufige Auftreten bestimmter geometrischer Muster an den Helixenden, in welche dieser Rest involviert ist. Im Bakteriorhodopsin wurden von 14 möglichen, insgesamt 9 „Cap Motive“ identifiziert:

Abbildung 39 Helixcaps im Bakteriorhodopsin (1c3w)



1) N-Terminus: Capping Box. 2) C-Terminus von Helix 1: kein Capping. 3) N-Terminus Helix 2: Big Box. 4) C-Terminus Helix 2: Schellmann Motiv. 5) N-Terminus Helix 3: kein Capping (Kontakt mit Wasser, grüne Kugeln). 6) C-Terminus Helix 3: Schellmann Motiv. 7) N-Terminus Helix 4: untypische Capping Box (keine Seitenketten involviert). 8) C-Terminus Helix 4: Abwandlung Schellmann Motiv ($\phi(C) > 0$). 9) N-Terminus Helix 5: Abwandlung Big Box (H-Brücken: $N4 \rightarrow N''/N4'/N5'$). 10) C-Terminus Helix 5: keine Daten. 11) N-Terminus Helix 6: „Kleine“ Kappingbox (H-Brücken: $Ncap \rightarrow N2$, $N2 \rightarrow Ncap$). 12) C-Terminus Helix 6: Long range Schellmannmotiv. 13) N-Terminus Helix 7: kein Capping (Kanaleingang). 14) C-Terminus : kein Capping.

Hydrophobe Aminosäuren

Hydrophobe Aminosäuren stellen den Hauptbestandteil von TM-Helices dar [95, 139], besitzen aber ebenso eine besondere Affinität für das Membran Interface [83]: Nach den aromatischen Aminosäuren und Asp⁻ ist die Positionierung von Leu, Met, Ile und Cys in diesem Bereich entsprechend mit den höchsten Energiegewinnen verbunden.

Mit Ausnahme von Cys sind jedoch alle hydrophoben Aminosäuren [181, 211] (Tabelle 8) am besten im hydrophoben Membranmilieu löslich [83]. Diese Reste besitzen dementsprechend eine deutliche Präferenz für Positionen innerhalb der Helix. Ausnahmen stellen aber z. B. C''' (Ala, Leu, Met), oder N'''' (Ile, Met) dar, welche bevorzugt innerhalb der Turnbereiche zu finden sind.

Die z. T. signifikanten Unterschiede beim Vergleich mit den Positionen in EM-Helices geben aber einen Hinweis darauf, dass diese Reste häufig bereits im hydrophoben Membranmilieu positioniert sein könnten (vgl. Abbildung 35, Abbildung 38). In diesem Fall geht der C-Terminus fast nahtlos in den N-Terminus der nächsten Helix über und der kurze Turn ragt dann nur wenig in das wässrige Milieu (z. B. Bakteriorhodopsin: Helix 2, C-Terminus).

Tabelle 8: Wichtige Hydrophobizitätsscalen zur Beurteilung der Wasserlöslichkeit von Aminosäuren

Aminosäure	Engelman-Steitz	Hopp-Woods	Kyte-Doolittle	Janin	Chothia	Eisenberg-Weiss
PHE	-3.7	-2.5	2.8	0.5	0.0	0.61
MET	-3.4	-1.3	1.9	0.4	-0.24	0.26
ILE	-3.1	-1.8	4.5	0.7	0.24	0.73
LEU	-2.8	-1.8	3.8	0.5	-0.12	0.53
VAL	-2.6	-1.5	4.2	0.6	0.09	0.54
CYS	-2.0	-1.0	2.5	0.9	0.0	0.04
TRP	-1.9	-3.4	-0.9	0.3	-0.59	0.37
ALA	-1.6	-0.5	1.8	0.3	-0.29	0.25
THR	-1.2	-0.4	-0.7	-0.2	-0.71	-0.18
GLY	-1.0	0.0	-0.4	0.3	-0.34	0.16
SER	-0.6	0.3	-0.8	-0.1	-0.75	-0.26
PRO	0.2	0.0	-1.6	-0.3	-0.9	-0.07
TYR	0.7	-2.3	-1.3	-0.4	-1.02	0.02
HIS	3.0	-0.5	-3.2	-0.1	-9.94	-0.40
GLN	4.1	0.2	-3.5	-0.7	-1.53	-0.69
ASN	4.8	0.2	-3.5	-0.5	-1.18	-0.64
GLU	8.2	3.0	-3.5	-0.7	-0.90	-0.62
LYS	8.8	3.0	-3.9	-1.8	-2.05	-1.1
ASP	9.2	3.0	-3.5	-0.6	-1.02	-0.72
ARG	12.3	3.0	-4.5	-1.4	-2.71	-1.8
Cut-Off Werte zur Unterscheidung zwischen hydrophob und hydrophil						
Hydrophob	-1.4	-0.75	0.70	0.10	-0.47	0.10
Hydrophil	1.85	1.65	-2.4	-0.45	-0.98	-0.51

3.1.2.2 *Helixcaps sind konservierte Struktur motive*

Die Onthogenense von Membranproteinen verläuft über die Assemblierung von vorgefertigten Sekundärstrukturen bzw. Domänen in Membranbereichen mit definierten biophysikalischen Eigenschaften [92, 99]. Verschiedene Kräfte sind dann für die Stabilisierung der fertig gefalteten Strukturen verantwortlich [10]. Die genaue Abmessung der hydrophoben Membranabschnitte ist sowohl für die Proteinfaltung, als auch für die Proteinfunktion und den Transport von entscheidender Bedeutung (Kapitel 1.4.3).

In diesem Kapitel wurde deshalb die Zusammensetzung der Helixcaps statistisch und am Beispiel des 7-Helix Bündels von Bakteriorhodopsin im Detail untersucht. Die Aminosäurezusammensetzung verweist auf den deutlich höheren Anteil aromatischer (v. a. Trp) und hydrophober Aminosäuren (v. a. Leu) an den Helixcaps von TM-Helices. Leu nimmt, wie am Beispiel des Schellmann Motivs beispielhaft demonstriert wurde, Schlüsselpositionen ein, die für die Ausrichtung der Helix im Membraninterface von entscheidender Bedeutung sein könnten (s. a. Abbildung 35, Abbildung 36).

Wie wichtig die Besetzung der verschiedenen Cap Positionen für die Faltung, bzw. Ausrichtung der Helices sind, unterstreicht außerdem das folgende Struktur Alignment (Ausschnitt FSSP) [212]. Die Struktur motive werden innerhalb entfernt verwandter Proteinfamilien wieder gefunden.

Abbildung 40: Ausschnitt aus dem Strukturalignment (FSSP) von Bakteriorhodopsin (1c3w)

	helix 3:	helix 4:
1c3wa	GLTMVPFGGEQNP	VDADQGTILALVGADGIMIGTGLV
1e12A bact_halva	GSIQSEGH.....RYVDWLLTTP	LNVWFLALLAGASREDTVKLVVLQALTI
1e12A bact_halva	GSIQSEGH.....RYVDWLLTTP	LNVWFLALLAGASREDTVKLVVLQALTI
1e12A bact_natph	GVGWVPVap.....RYIDWILTTPL	LIVYFLGLLAGLDSREFGIVITLNTV
1e12A bact_natph	GVGWVPVap.....RYIDWILTTPL	LIVYFLGLLAGLDSREFGIVITLNTV
1f88A opsd_bovin	~fVFg~~~~~cNLEGFFATLGGEIAL	WLSLVVLaERYv~~~~~wVMALACAAPp~w
1f88A opsd_phovi	~fVFg~~~~~cNLEGFFATLGGEIAL	WLSLVVLaERYv~~~~~wVMALACAAPp~w
1f88A opsd_canfa	~fVFg~~~~~cNLEGFFATLGGEIAL	WLSLVVLaERYv~~~~~wVMALACAAPp~w
1f88A opsd_sardi	~fVLg~~~~~cNLEGFFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wGMALACTVPP~w
1f88A opsd_limpa	~fVLg~~~~~cNLEGFFATLGGEIAL	WLSLVVLaerWi~~~~~wVMALSCAVPP~w
1f88A opsd_sarxa	~fVLg~~~~~cNLEGFFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wGMALACTVPP~w
1f88A opsd_sarmi	~fVLg~~~~~cNLEGFFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wAMALACTVPP~w
1f88A opsd_sarsp	~fVLg~~~~~cNLEGFFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wVMALACTVPP~w
1f88A opsd_sarpu	~fVLg~~~~~cNMEGFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wFMALACTVPP~w
1f88A opsd_neoau	~fVLg~~~~~cNIEGFFATLGGMISL	WSLAVLaerWv~~~~~wLLALSCTVPP~w
1f88A opsd_xenla	~fFFg~~~~~cSIDAFVGTGLTGLVTG	WSLAFLaERYi~~~~~wIIGIVSVPP~w
1f88A opsv_oryla	~yFFg~~~~~cALEAAVGAVAGLVT	SWSLAVLseRYl~~~~~wFMGMV.RCPp~w
1f88A opsb_human	~fVFg~~~~~cALEGFLGTVAGLVTG	WSLAFLaERYi~~~~~wTIGIGVSIpp~w
1f88A O46555	~fVFg~~~~~cALEGFLGTVAGLVTG	WSLAFLaERYi~~~~~wTIGIGVSIpp~w
1f88A O57605	~fVFg~~~~~cAFEGFMGATAGLVTG	WSLAFLaERYi~~~~~wVIGIGVAIPp~w
1qlaC frdc_helpy	~~~~~tQNFwlyIFLLFAVELHGSIG	LYRLAi~lRKVKWAMSVFFIVLGLCTYG
1qlaC O34253	~~~~~hGGLgfyLLLLLVSTLHAGIG	AYRLil~iRNVRSgVFGVLTLLALWADF

Die Eingabesequenz von Bakteriorhodopsin wird innerhalb von vier Strukturen wieder gefunden: 1e12: Halorhodopsin, 1f88: Rhodopsin, 1qla: Fumarat reductase. Die identischen Reste (hier farbig wiedergegeben) befinden sich für die entfernt verwandten Strukturen (Sequenzidentität < 30 %) alle am Helixende (Leu: in C3, C1 und als Ccap). Die Positionierung der Leu Reste in den verschiedenen Capmotiven im Membraninterface wurden überprüft: Sie befanden sich alle in einer äquivalenten Lage wie das Ccap von Helix 3.

3.2 Abmessungen helikaler Membrandomänen

3.2.1 Ergebnisse

3.2.1.1 Durchschnittslänge einer TM-Helix und der Helixenden

Die Koordinaten der Membranebenenpunkte sind in Tabelle 9 angegeben. Auf Grund der für Kanalproteine typischen Topologie (Abbildung 15) streuen die TM-Helixlängen beim Chloridkanal und den Aquaporinen von 8-24 Aminosäuren, während die Mindestlänge einer TM-Helix ansonsten 15 Reste beträgt. Die Durchschnittslänge eines TM-Abschnitts beträgt 18,3 Reste, oder 27,5 Å, bzw. 7,6 Helixwindungen (Tabelle 15). Die Helixenden ragen demnach auf jeder Seite der Membran um durchschnittlich 4,05 Reste, oder 1,2 Helixwindungen in das polar-wässrige Milieu.

Tabelle 9: Koordinaten der Membranebenenpunkte

Helikale Proteine	PDB-Code	X1*	Y1	Z1	X2	Y2	Z2
1) Bakteriell Rhodopsin							
Bakteriorhodopsin	1c3w	9,085	36,552	-1,617	23,061	38,508	9,190
Halorhodopsin	1e12	4,290	24,055	92,805	5,742	23,060	65,200
Sensorisches Rhodopsin II	1jgj	54,135	13,402	3,050	57,738	41,147	1,780
2) G-Protein gekoppelter Rezeptor							
Rhodopsin	1f88	54,870	18,036	19,389	36,822	12,639	-6,741
3) Photosynthetisches Reaktionszentrum							
	1aig	53,366	90,254	20,732	63,291	106,230	31,372
	1prc	126,570	76,144	11,360	112,187	53,105	19,093
4) Photosystem I							
	1jb0	102,778	117,856	64,730	102,061	118,069	89,511
5) Bakterieller Lichtsammelnder Komplex							
Lichtsammelnder Komplex II	1lgh	45,802	-0,013	93,307	45,802	-0,013	62,873
	1kzu	9,777	13,016	12,873	19,707	15,977	38,358
Lichtsammelnder Komplex III	1ijd	13,460	11,570	33,270	18,686	15,940	11,039
6) Cytochrome c Oxidase / Atmungskomplex IV / Ubiquinol Oxidase							
Cytochrom C Oxidase	1ar1	-1,183	-1,463	56,290	6,817	18,078	39,733
	1ehk	77,384	30,841	5,730	99,134	12,771	5,003
	2occ	95,402	319,495	189,012	96,274	318,693	199,597
Ubichinol Oxidase	1fft	11,078	157,229	88,021	-5,598	186,983	90,969
7) Cytochrome bc1 / Atmungskomplex III							
Cytochrom bc1	1be3	31,708	127,286	19,996	25,298	121,577	20,052
	1bcc	19,297	109,534	66,252	17,436	128,914	70,197
	1ezv	-27,121	38,751	-4,830	-20,313	46,313	-11,032
8) Fumaratreduktase/ Succinatdehydrogenase / Atmungskomplex II							
	1fum	47,052	1,380	-78,379	34,179	-4,308	-59,003
	1qla	19,507	8,206	-49,774	22,924	6,129	-26,647
9) Kalium Kanal							
	1jvm	78,756	26,688	35,277	71,668	26,718	16,922
10) Mechanosensitiver Ionenkanal							
	1msl	16,656	119,938	-0,007	27,680	128,092	-0,084
11) Aquaporine und Verwandte							
Glycerol Facilitator GlpF	1fx8	27,428	59,314	167,795	32,875	57,115	155,125
13) P-type ATPase							
	1eul	1fx8	58,438	18,019	13,963	60,667	11,638

*Die x, y z Koordinaten fixieren die Schnittpunkte der beiden Membranebenen senkrecht zur Membrannormale (Abbildung 41).

3.2.1.2 *Ganghöhe der untersuchten TM-Helices*

Der durchschnittliche Anstieg pro Rest ist $1,50 \text{ \AA}$ ($3,7$ Reste bzw. $5,55 \text{ \AA}$ pro Windung) und bestätigt die Ergebnisse der früheren Untersuchung eines kleineren Datensatzes von Membranproteinen ($1,49 \text{ \AA}$) [213]. Die langen Helices globulärer Proteine sind 12 - 25 Reste lang (\emptyset -Länge = 16 Reste, bzw. 24 \AA) und steigen mit durchschnittlich $1,52 \text{ \AA}$ pro Rest an ($3,6$ Reste pro Windung). Die mittleren Abstände zwischen zwei in der Helix aufeinander folgenden Reste stimmen mit dem allgemeinen für Helices globulärer Proteine gefundenen Wert von $1,51 \text{ \AA}$ überein [75].

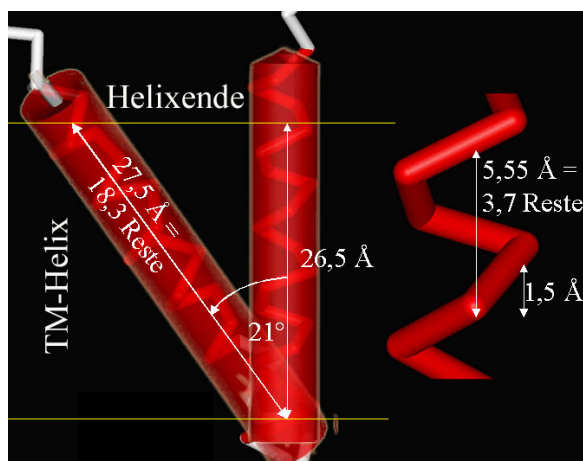
3.2.2 Diskussion

3.2.2.1 *Länge einer TM-Helix im Verhältnis zur Membrandicke*

Viele Autoren umgehen eine aufwendige Bestimmung der Membrangrenzen und verwenden die Sekundärstruktur als alleiniges Kriterium [87]. Die in bisherigen Analysen bekannter Membranstrukturen, bzw. -sequenzen untersuchten Helices sind mit einer \emptyset -Länge von $26,4$ Resten [213], bzw. 20 - 21 Resten [107, 130] entsprechend länger, als die in dieser Arbeit ausgewählten TM-Abschnitte. [214] verwenden in ihrer Analyse ein Fenster von 17 Aminosäuren für vorhergesagte Membranhelices und sind daher am ehesten mit den hier verwendeten Längen vergleichbar.

Die mittlere Länge der TM-Helices ist mit $27,5 \text{ \AA}$ nur wenig länger als die veranschlagte Membrandicke von $27,0 \text{ \AA}$. Die Helices stehen aber im Durchschnitt nicht senkrecht in der Membran, sondern sind um 21° geneigt [213]. Die durchschnittliche Helixlänge von $27,5 \text{ \AA}$ entspricht also einer Membrandicke von $26,5 \text{ \AA}$ (Abbildung 41). Die erfassten Aminosäuren liegen also außerhalb des deutlichen Einflussbereichs der polaren Lipidköpfchen, welcher bei 20 \AA [183], bzw. 24 \AA Membrandicke beginnt [109] und erst ab 27 \AA stark zunimmt [83]. Dieser Wert konnte für das Bakteriorhodopsin durch Anwendung einer neuen Methode bestätigt werden (Abbildung 30), was auf eine auch insgesamt recht exakte Bestimmung der Membrangrenzen schließen lässt.

Abbildung 41: Maße der verwendeten TM-Helices



Die durchschnittliche Länge der Helices von $27,5 \text{ \AA}$ entspricht bei einer Neigung („Tilt“ = Winkel zur Membrannormalen, senkrecht zur Membran) von 21° einer „Membrandicke“ von $26,5 \text{ \AA}$. $3,7$ Reste machen eine Helixwindung, mit einer Ganghöhe von $5,55 \text{ \AA}$. Der mittlere Abstand zwischen zwei Resten entlang der Helixachse entspricht $1,5 \text{ \AA}$.

3.3 Aminosäurezusammensetzung helikaler TM-Abschnitte

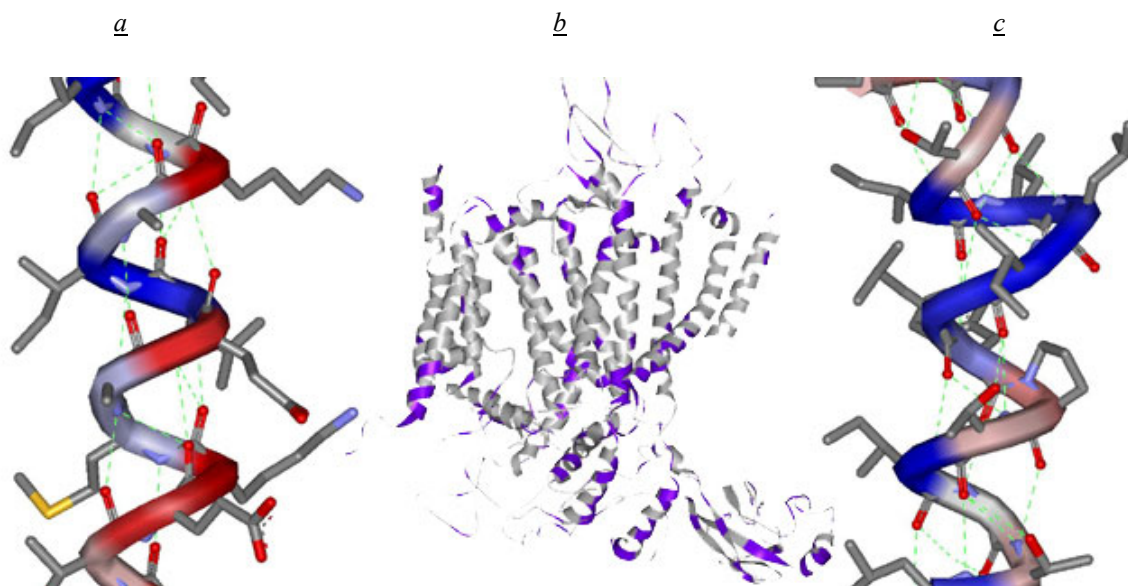
3.3.1 Ergebnisse

3.3.1.1 Aminosäurezusammensetzung von alpha-Helices und beta-Barrels im Vergleich

Die 144 untersuchten zentralen TM-Helixabschnitte sind überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren zusammengesetzt (66,8 %) (Tabelle 10 ,Abbildung 42 a). 2028 Reste (93,9 % des Gesamtdatensatzes) setzen sich aus 13 verschiedenen Aminosäuren zusammen, von denen nur vier (Ser, Thr, Tyr und His) schwach polare Seitenketten aufweisen. TM-Helices enthalten nur 8,2 % hydrophile Aminosäuren, welche neben den hydrophoben Resten (43,8 %) einen Hauptbestandteil (39 %) der Helices globulärer Proteine bilden (Abbildung 42 c).

Die β -Barrel nehmen entsprechend ihrer Innen- Außenseitenarchitektur mit 46,6 % hydrophoben und 19,7 % hydrophilen Resten eine Mittelposition ein (Abbildung 3) [34]. Der Anteil hydrophober Reste die in Kontakt mit der Membran sind liegt mit 66,7 % aber genauso hoch, wie bei den TM-Helices (Abbildung 43). Typische β -Faltblattbildner wie Val und Tyr sind dabei häufiger als Leu, welches überwiegend die Formation von α -Helices fördert [215].

Abbildung 42: „Typische Helix“ eines globulären (5nul) und eines TM-Proteins (1be3)



a) wasserlösliche globuläre Proteine besitzen typischerweise amphipatische (und mehr oder weniger stark gekrümmte) Helices [216]. Die dem wässrigen Milieu zugewandte Seite ist mit hydrophilen Aminosäuren (rot) besetzt. Die gegenüberliegende Seite liegt im Proteininnern und ist überwiegend hydrophob (blau).

b) Im Cytochrom bc1 sind innerhalb der Membrangrenzen ausschließlich hydrophobe Aminosäuren (grau) zu finden. Außerhalb, im wässrigen Milieu entspricht die Zusammensetzung der von wasserlöslichen globulären Proteinen (blau, polare Reste).

c) Stacking hydrophober Aminosäuren in einer typischen TM-Helix in $i, i+4$ Position (links). Mehrere Thr (vorne) sind in $i, i+3$ Wasserstoffbrückenbindungen involviert. Prolin (mitte, rechts) verursacht einen Knick und N-terminal einen π -bulge und lässt eine Carbonylgruppe in $i, i+4$ Position ohne Hauptkettenwasserstoffbrücke.

β -Barrel bestehen sonst zu einem Drittel (33,6 %) aus einer Gruppe weder besonders hydrophober, noch außerordentlich hydrophiler Aminosäuren [181, 211], wie z. B. Tyr, Gly und Ser. TM-Helices setzen sich zu einem Viertel (24,9 %) aus solchen Resten zusammen und besitzen auch für das Thr und Pro das höchste Vorkommen aller hier untersuchten Helices (17,2 % bei Helices globulärer Proteine).

Tabelle 10: Aminosäurezusammensetzung von Membranproteinen und Helices globulärer Proteine:

	<i>Membranhelices</i>			<i>β-Barrel</i>			<i>Globuläre Proteine</i>				
	TM-Helices		Helix Enden*	Membran- abschnitte	Membran- Kontakt**		lange Helices		Helices		β - Faltblatt
	N	%	%	N	%	%	N	%	%	P***	P***
<i>leu</i>	368	17,0	15,0	56	8,7	12,6	106	9,8	10,7	1,3	1,2
<i>ala</i>	267	12,4	9,0	68	10,6	12,6	143	13,3	12,5	1,5	0,8
<i>phe</i>	223	10,3	5,6	44	6,9	10,2	39	3,6	3,8	1,0	1,4
<i>val</i>	210	9,7	6,8	69	10,7	15,1	75	7,0	6,2	0,9	1,7
<i>gly</i>	188	8,7	5,3	66	10,3	7,7	37	3,4	3,6	0,4	0,6
<i>ile</i>	184	8,5	7,0	28	4,4	9,1	69	6,4	5,6	1,2	1,8
<i>thr</i>	130	6,0	6,6	35	5,5	3,9	50	4,6	4,5	0,7	1,3
<i>ser</i>	107	5,0	4,1	40	6,2	1,8	48	4,4	4,3	0,7	0,9
<i>met</i>	96	4,4	3,7	15	2,3	3,2	35	3,2	2,6	1,4	1,3
<i>trp</i>	75	3,5	3,3	19	3,0	3,9	21	1,9	1,4	1,0	1,2
<i>his</i>	67	3,1	8,4	10	1,6	0,7	22	2,0	2,1	1,0	0,9
<i>tyr</i>	65	3,0	4,2	67	10,4	14,7	31	2,9	3,3	0,9	1,5
<i>pro</i>	48	2,2	3,3	8	1,2	1,4	5	0,5	1,5	0,5	0,4
<i>asn</i>	26	1,2	1,8	20	3,1	1,4	39	3,6	3,3	0,8	0,6
<i>cys</i>	22	1,0	0,7	0	0,0	0	41	3,8	1	0,9	1,2
<i>arg</i>	21	1,0	4,0	26	4,0	0	53	4,9	5,4	1,4	0,7
<i>gln</i>	20	0,9	2,0	23	3,6	1,1	51	4,7	4,9	1,4	0,8
<i>lys</i>	17	0,8	2,7	15	2,3	0	82	7,6	10,7	1,1	0,9
<i>glu</i>	14	0,6	3,3	13	2,0	0	84	7,8	7,8	1,4	0,8
<i>asp</i>	12	0,6	1,6	20	3,1	0,7	48	4,4	4,8	0,8	0,5
total	2160	100	100	642	100	100	1079	100	100		

Rot = hydrophile Reste Blau = hydrophobe Reste (Tabelle 8)

*Durchschnittslänge: 8,1 Aminosäuren/TM-Helix **Berechnung s. Abbildung 32 ***Propensity nach [215]. Diese Tabelle greift ausschließlich auf nicht redundante Daten zurück (Tabelle 2, Tabelle 3). Für die TM-Proteine wurden nur die im hydrophoben Membranbereich liegenden Abschnitte verwendet.

Bei den globulären Proteinen wurde neben einer Auswahl von [145], ein Datensatz mit „langen Helices“ verwendet: 1A5M, 1A7T, 1ABE, 1ABH, 1ACF, 1AG9, 1AJZ, 1AK1, 1AKE, 1AMK, 1ANF, 1ATZ, 1AW7, 1BDM, 1BRT, 1BSL, 1BUP, 1CHN, 1COL, 1CYD, 1EBH, 1GCG, 1IIB, 1LDG, 1LLD, 1LPE, 1LUC, 1MBP, 1MDL, 1MRR, 1NFP, 1NPC, 1NPX, 1INZY, 1ONE, 1PBP, 1QUI, 1RCB, 1ROP, 1SBP, 1THB, 1TMY, 1TPB, 1TYS, 1UBS, 1UDA, 1VID, 1VOM, 1WOD, 1XJO, 1XPB, 1YMV, 1ZIN, 265B, 2AK3, 2CHE, 2CHF, 2CMD, 2CTS, 2DRI, 2HAD, 2HBG, 2MHB, 2MNR, 2UDP, 3GBP, 3UKD, 3XIS, 4SDH, 5NUL.

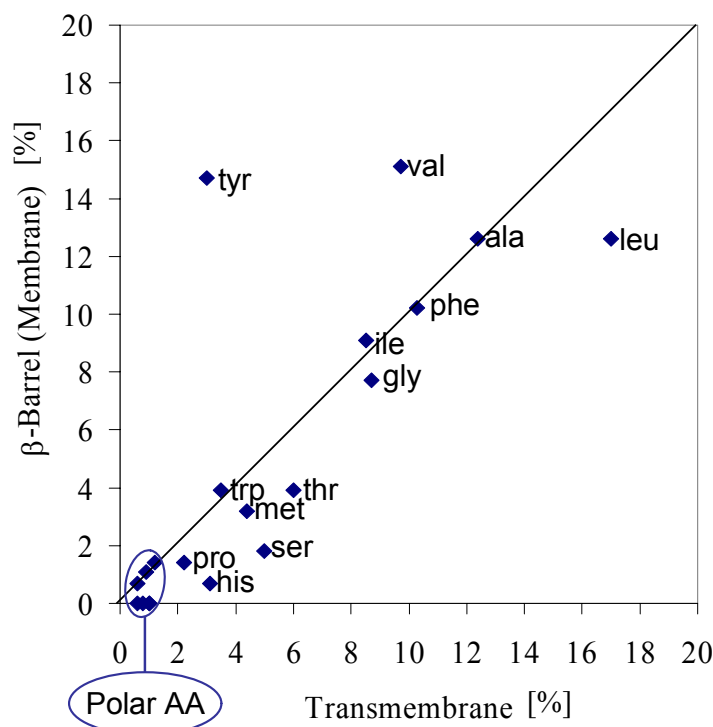
3.3.2 Diskussion

3.3.2.1 Die Aminosäurekomposition ist vorwiegend vom Milieu abhängig

Die Aminosäurekomposition der TM-Helices und diejenige der „Außenseite“ (und demnach in direktem Kontakt mit der Membran) der β -Barrel Membranproteine sind weitgehend identisch (Abbildung 43). Im Gegensatz dazu gibt es bzgl. der Aminosäurezusammensetzung nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen den α -Helices von globulären und von Membranproteinen (z. B. Y, S, T). Demgemäß ist die Aminosäurekomposition der hier untersuchten Sekundärstrukturen überwiegend vom Milieu abhängig. Die polaren Aminosäuren (E, D, K, Q, R, N) sind häufiger im wässrigen, die hydrophoben (L, F, V, I) häufiger im hydrophoben Milieu. Spezifisch für die β -Barrels sind der β -Faltblattbildner Val und das im Membraninterface häufige Tyr, für die TM-Helices das Leu (Ser, Thr, His).

Im Allgemeinen korrelieren deshalb innerhalb der Membran Hydrophobizität und „Helizität“ einer Aminosäure miteinander. Ile und (in abnehmender Reihenfolge) Leu, Val, Met, Phe und Ala sind auch die Aminosäuren mit der experimentell am höchsten bewerteten „Helizität“ in der Membran [217]. Der Energietransfer der häufigen Aminosäuren Leu, Val und Ile vom wässrigen in das hydrophobe Milieu der Membran ist dann so gewinnbringend, dass gleichzeitig auch eine ganze Reihe von Aminosäuren mit geringerer Hydrophobizität bzw. Helizität (z. B. Ser, Thr) in die Membran überführt werden können. Auf diese Art und Weise gelangen wichtige funktionelle Gruppen und somit auch polare, oder geladene Aminosäuren in die Membran [83]. Einige der daraus resultierenden strukturellen Besonderheiten werden im Anschluss bzw. in Kapitel 3.5.2.4 diskutiert.

Abbildung 43: Aminosäurehäufigkeiten von Transmembran Domänen

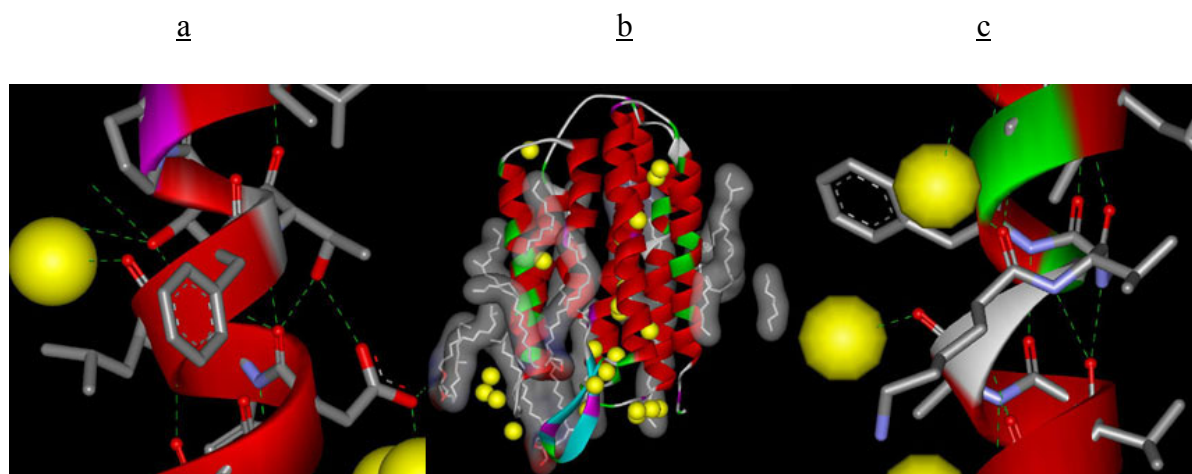


3.3.2.2 Gly ist eine hydrophobe Aminosäure

Das gleichermaßen häufige Vorkommen von Gly in der Außenseite von β -Barrel und in α -helikalen Membranproteinen spricht für den vergleichsweise hydrophoben Charakter dieser Aminosäure (Tabelle 8). Die Hauptkette ist bei dieser kleinen Aminosäure nur wenig abgeschirmt. Trotzdem kommt diese Aminosäure innerhalb von membrangebundenen Sekundärstrukturen mehr als doppelt häufig vor als im wässrigen Milieu. Gly (ebenfalls Thr und Ser) werden deshalb innerhalb der Membran v. a. in bestimmten dicht gepackten Kontaktmotiven zwischen benachbarten Helices gefunden (Abbildung 50), welche vorwiegend über $C\alpha-H \cdots O$ Wasserstoffbrücken stabilisiert werden [218, 219].

Durch das Fehlen sterischer Hinderungen kann diese Aminosäure außerdem ungewöhnliche Torsionswinkel annehmen und somit die Flexibilität der Hauptkette erhöhen (Abbildung 44) [220]. Im Bakteriorhodopsin liegt die Hälfte aller Gly innerhalb des hydrophoben Bereichs der Lipiddoppelschicht. In Helix G dient so ein Gly, während der photoinduzierten Abgabe eines Protons, als Scharnier zur Öffnung des Protonenkanals. Dabei wird der oberhalb eines π -Bulges gelegene Helixabschnitt nach Konformationsänderung des Retinals (unten nicht abgebildet) aus dem Kanalbereich gedreht [39]. Die freie $>C=O$ - Gruppe dient hier als zusätzlicher Bindungspartner für Wasser.

Abbildung 44: Pro und Gly in Bakteriorhodopsin (1c3w)



Bakteriorhodopsin mit Pro und Gly in Magenta und Grün gefärbt.

a) In Helix C verursacht Pro 91 einen Knick (grau). Dadurch kann vier Aminosäuren vorher (N-terminal) ein Wassermolekül (gelb) an den Carbonylsauerstoff von Leu 89 binden. (Eine analoge Situation wird in Helix B durch Pro 50 und Thr 46 verursacht). Rechts unten wird die Ladung von Asp durch Wasserstoffbrücken mit Thr und Wasser abgeschirmt.

b) Von 22 Gly liegen im Bakteriorhodopsin zehn, von zehn Pro drei innerhalb der helikalen TM-Abschnitte (Lipide mit transparenter Oberfläche). Die restlichen Pro und Gly sind in den Helixendkappen, bzw. Loops positioniert.

c) Durch Gly verursachter π -Bulge (grau) und Knick (15°) in Helix G.

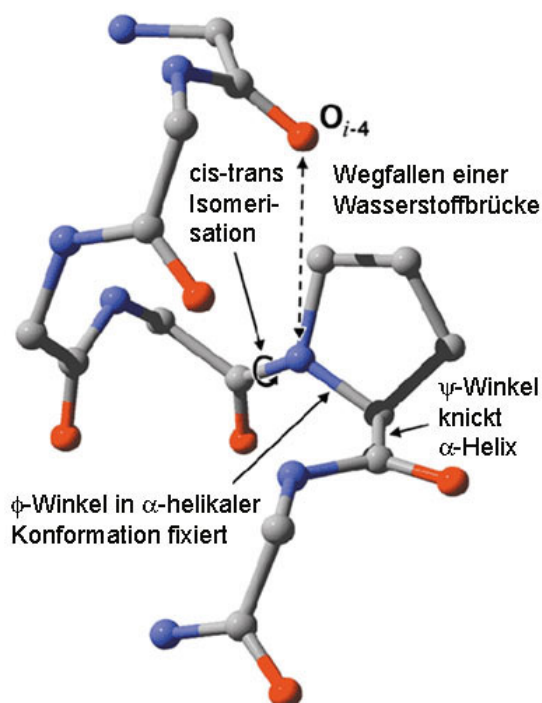
3.3.2.3 Die enorme Bedeutung von Pro für α -helikale Membranproteine

Pro gilt im wässrigen Milieu als Helixbrecher [215], ist aber in TM-Helices um ein vielfaches häufiger vertreten als in Helices globulärer Proteine (Abbildung 44, Abbildung 46) [221]. In einer Helixposition nahe der Membranmitte führt dieser Rest in etwas mehr als der Hälfte der Fälle zu einem deutlichen Abknicken der Helix, [188] (s. a. Tabelle 17) aber nur am Helixanfang zu einem Turn [222].

In die Ringstruktur eingebunden ist der ϕ -Winkel außerdem in α -helikaler Konformation fixiert (Abbildung 45). In Membranproteinen muss Pro deshalb insbesondere in N-terminalen Positionen als Turnbrecher bezeichnet werden. Im wässrigen Milieu besitzt diese Aminosäure deshalb ebenso β -Faltblatt verhindernde Eigenschaften. Das relativ häufige Vorkommen von Pro in TM-Helices findet so eine ontogenetische Begründung:

Die in TM-Helices dominanten β - verzweigten Aminosäuren begünstigen im wässrigen Milieu β -Faltblätter [181], welche z. B. während der Biosynthese im Translokton zu unerwünschten Aggregaten (β -Amyloiden) führen können [210]. Die energetische Destabilisierung solcher für den Organismus oftmals fataler Zwischenstufen [223] könnte deshalb ein entscheidender Schritt zur Stabilität und Vielfalt von α -helikalen Membranproteinen während der Evolution darstellen [224].

Abbildung 45: Pro induzierte geometrische Restriktionen in einer α -Helix:



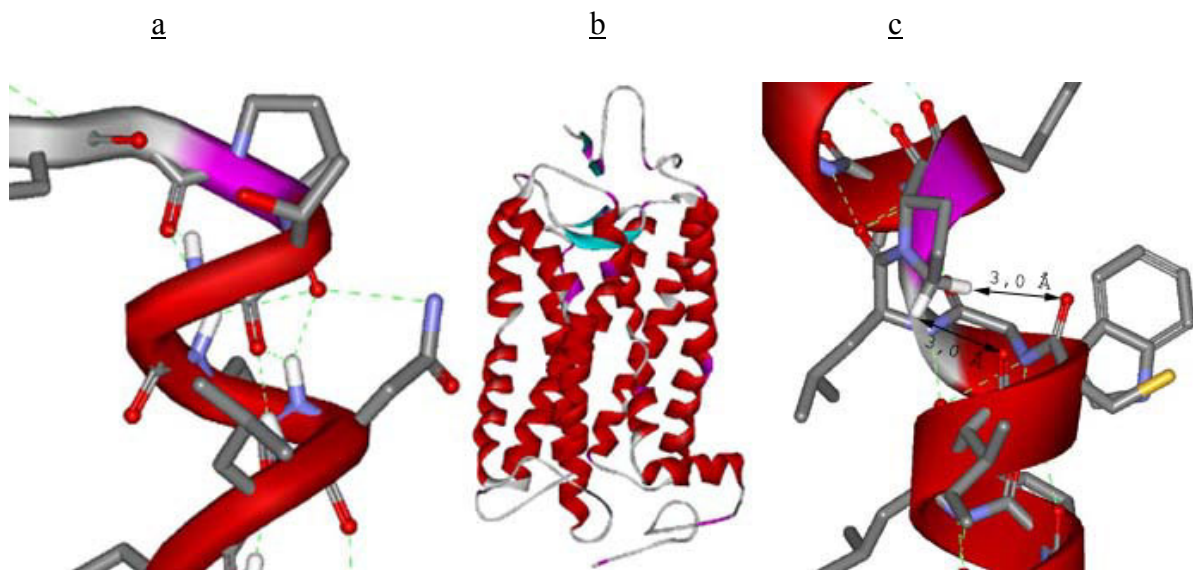
Auf Grund des Ringschlusses fallen die $\text{Pro}_i\text{-O}_{i-4}$ H-Brücken weg. Deshalb liefert diese Iminosäure einen vergleichsweise geringen Beitrag zur Stabilisierung der α -helikalen Konformation. Der ϕ -Winkel ist aber aus dem gleichen Grunde auf diese Sekundärstruktur festgelegt. Daher ist Pro oftmals der erste Rest in TM- α -Helices (N-terminal: Turnbrecher) und verhindert im wässrigen Translokton-Milieu vermutlich β -Faltblattbildung und Aggregation [210].

Der ψ -Winkel führt häufig zu einem Knick in der Helix. Dieser kann aber durch cis-trans Isomerisation wieder aufgehoben werden. Die C^δ -Position besitzt in direkter Nachbarschaft zum Stickstoff eine positive Partialladung und kann deshalb ebenfalls mit dem O_{i-4} wechselwirken. Die mögliche Bedeutung solcher Wechselwirkungen innerhalb von TM-Proteindomänen wird in dieser Arbeit in Tabelle 17 erstmals quantifiziert.

Die C-H Gruppen in C^δ-Position von Pro besitzen auf Grund der direkten Nachbarschaft zum Stickstoff außerdem eine positive Partialladung. $>\text{C}^{\delta}\text{-H} \cdots \text{O}=\text{C}<$ Wasserstoffbrückenbindungen dienen deshalb zur Stabilisierung der freien $>\text{C}=\text{O}$ Gruppen in i-4, bzw. i-3 Position [190] (Tabelle 17). Innerhalb der Membran könnten solchen Wechselwirkungen, zusätzlich funktionelle Eigenschaften zukommen. Der Wechsel von einer C^δ-H \cdots O_{i-3} auf die C^δ-H \cdots O_{i-4} Position lässt die Helix im Durchschnitt um weitere 10° abknicken [190]. Pro könnte somit eine wichtige Aminosäureposition bei der Feinmodulation enzymatischer Prozesse, wie bei der Reizübertragung darstellen (Abbildung 46).

Pro ist zudem die einzige „Aminosäure“ die ein nennenswertes Vorkommen als Cis Konformer besitzt [225]. Cis-Trans Isomerisierung der Amidbindung zwischen der Aminosäure_{i-1} und Pro_i kann neben der Rotation um den ψ -Torsionswinkel zur Aufhebung eines Knicks in der Helix führen [221]. Die durch Pro induzierte strukturelle Flexibilität gibt dieser Aminosäure deshalb eine wichtige Rolle bei der Öffnung von Kanalproteinen und Transportern [226]. Das relativ häufige und konservierte Auftreten von Pro auch in vorhergesagten TM-Helices spricht ohnehin für eine zentrale Rolle während der Faltung und für die Proteinfunktion [145].

Abbildung 46: Pro in verschiedenen Positionen im Rinder Rhodopsin (1f88)



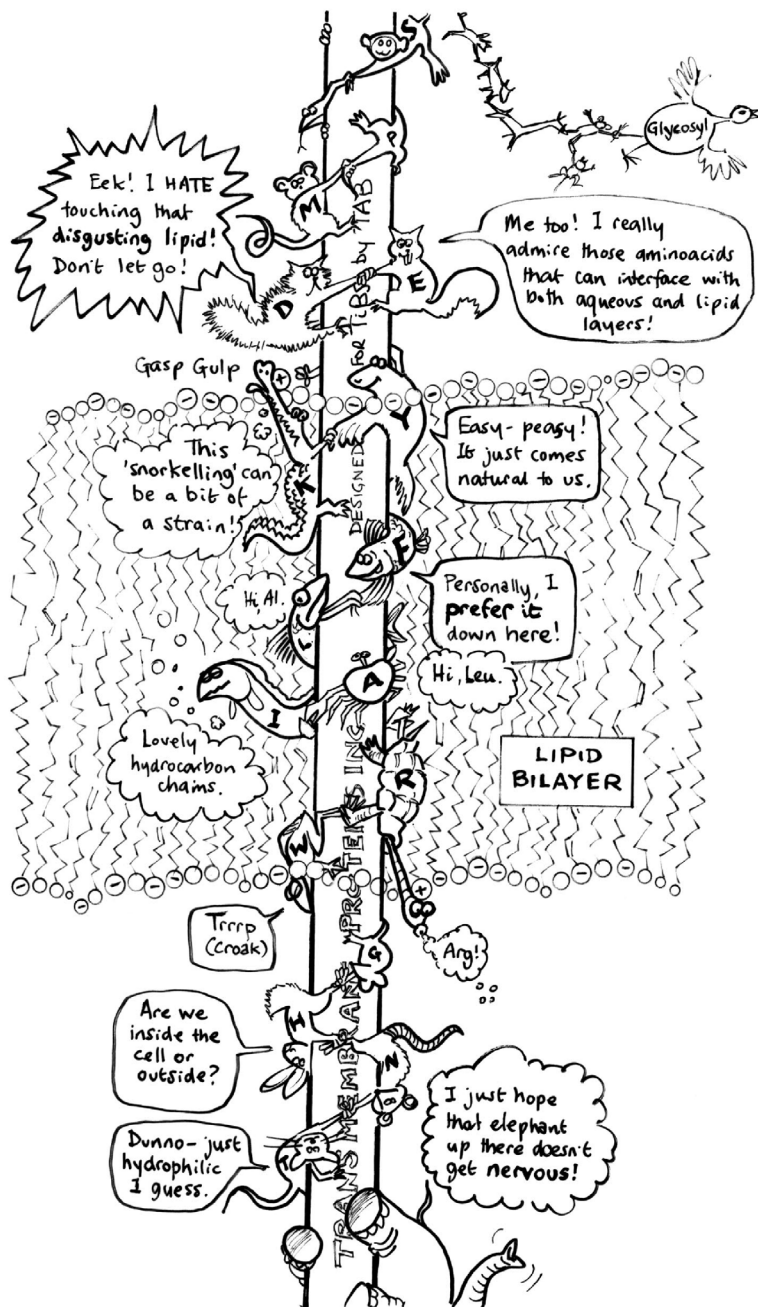
a) Detailaufnahme des C-Caps von Helix 3 mit Prolin in C-Cap Position. An den Helixenden ist Pro häufig in Helix-Turn Motiven (Helixcaps) zu finden.

b) TM-Helices (rot) und β -Faltblatt (türkis) im Rinder Rhodopsin (1f88) mit Pro (Magenta) im inaktiven Zustand. Helix 3 wird von Helix 6 im Vordergrund gekreuzt. Im aktivierten Zustand sind die cytoplasmatischen Termini (hier unten) weiter voneinander getrennt [227].

c) Detailansicht des Knicks von Helix 6: Die Iminosäure Pro (267) unterbricht die regelmäßige Anordnung von H-Brücken (grün gestrichelt). Die $>\text{C}^{\delta}\text{-H}$ von Pro sind dabei gleichweit von den Carbonylsauerstoffen des Cys (264) und Ile (263) entfernt, was die Ausbildung von Seitenketten-H-Brücken ermöglicht. Der vergrößerte Abstand der Enden von Helix 6 und 3 im aktiven Zustand wäre durch die Verringerung des Knicks in Helix 6 um etwa 10° und mit der stärkeren Wechselwirkung zwischen Pro (267) und Ile (263) erklärbar.

Pro besitzt außerdem als Iminosäure keine Aminogruppe und hinterlässt deshalb in der Hauptkette eine Helixwindung vorher, ein bis zwei freie $>C=O$ Gruppen, welche innerhalb der Membran oft als Bindungsstellen für Liganden, oder prosthetische Gruppen genutzt werden [138, 228] (Abbildung 45). Im Bakteriorhodopsin führen Pro 50 in Helix B und Pro 91 in Helix C zu einem Knick [39]. Die freien $>C=O$ Gruppen von Thr 46 und Leu 89 binden über Wassermoleküle an Helix G und D und sind deshalb wichtige Reste der Proteinfaltung (Abbildung 44) [229].

Abbildung 47: Bevorzugte Aminosäurepositionen in Membranhelices [136]



Diese Zeichnung beschreibt die bevorzugten Aminosäurepositionen in der TM-Helix eines bitopischen Membranproteins [136]. Gly, Pro, Ser und Thr besitzen aber in polytopischen Membranproteinen außerdem ein hohes Vorkommen innerhalb des hydrophoben Membranabschnitts [90]. Dort überwiegen ansonsten die hydrophoben Reste wie Leu, Ile, Val, Ala und Phe. Arg und Trp sind gewöhnlich auf der Cis-Seite der Membran (hier unten) zu finden, Lys und Tyr auf der Trans-Seite [3]. Hydrophile Reste befinden sich in der Regel im bzw. im Übergangsbereich zum wässrigen Milieu. In dem folgenden Kapiteln wird dieses etwas vereinfachte Bild „einer typischen TM-Helix“ (Abbildung 47) verfeinert und an Tertiärstrukturbegebenheiten (Nachbarschaften) angepasst.

3.4 Packungsanalyse helikaler Membrandomänen

3.4.1 Ergebnisse

3.4.1.1 Aminosäurezusammensetzung der Kontakte helikaler Membrandomänen

In Tabelle 11 und Tabelle 14 wird die Zusammensetzung der unterschiedlichen Kontaktflächen nach Aminosäure- und Atomtypen aufgelistet. Die in das hydrophile Milieu ragenden Enden der TM-Helices (hier: Helixende: 4+4 Aminosäuren) und die im hydrophoben Milieu positionierten zentralen TM-Abschnitte (hier: TM-Helix) wurden jeweils in einer eigenen Gruppe untersucht. Der Anteil hydrophober Aminosäuren ist an den Helixenden deutlich niedriger, aber keineswegs identisch [95, 183] mit der von Helices in globulären Proteinen (Tabelle 1).

Tabelle 11: Aminosäurezusammensetzung unterschiedlicher Kontaktflächen

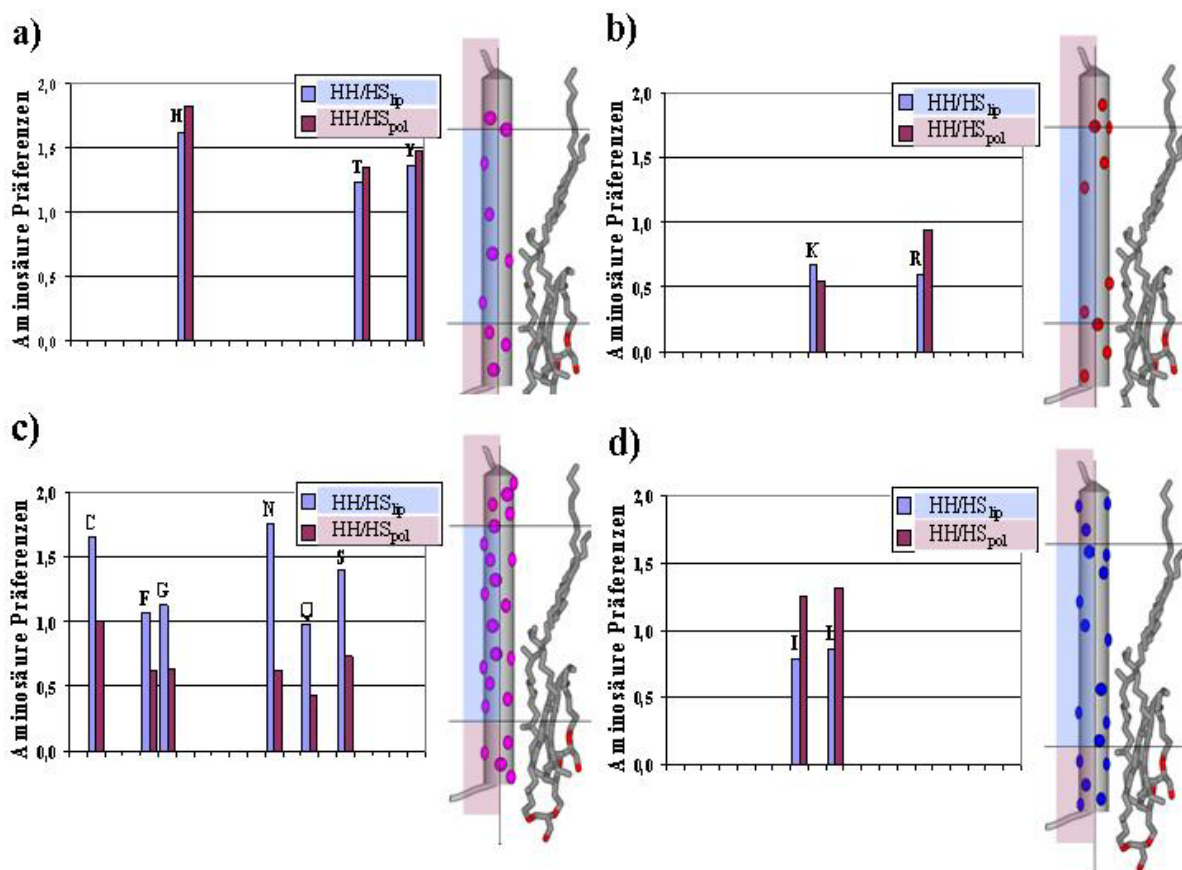
Cut off = 0 Å	TM-Helix				TM-Helixende				*Helix globu- lärer Proteine	
	HH _{lip}		HS _{lip}		HH _{pol}		HS _{pol}		HH	HS
	%**	P***	%**	P***	%**	P***	%**	P***	P	P
ALA	11,8		13,1	1,22	8,4	0,78	9,7			
ARG	0,7	<u>0,30</u>	1,2	<u>0,49</u>	3,9	1,56	4,1	1,65		
ASN	1,5		0,9	<u>0,59</u>	1,4	0,91	2,2	1,46	0,84	
ASP	0,6	<u>0,54</u>	0,5	<u>0,49</u>	1,5	1,41	1,7	1,56	0,79	
CYS	1,3	1,46	0,8	0,89	0,7	0,83	0,7	0,83		
GLN	0,9	<u>0,62</u>	0,9	<u>0,63</u>	1,2	0,83	2,8	1,91	0,89	
GLU	0,6	<u>0,32</u>	0,7	<u>0,33</u>	3	1,52	3,6	1,82	0,85	
GLY	9,3	1,32	8,2	1,18	4,1	<u>0,59</u>	6,4			0,88
HIS	3,9	<u>0,67</u>	2,4	<u>0,41</u>	10,8	1,89	5,9			
ILE	7,6		9,6	1,23	7,8		6,2	0,80	1,17	
LEU	15,9		18,4	1,14	17		13	0,81	1,22	
LYS	0,6	0,37	0,9	<u>0,55</u>	1,9		3,4	1,99	0,87	
MET	4,7	1,13	4,3		4,3		3,2	0,78	1,18	
PHE	10,7	1,34	10,1	1,26	4,3	<u>0,54</u>	6,9	0,86	1,21	
PRO	2,2	0,80	2,3	0,82	3		3,6	1,31		
SER	5,8	1,28	4,1		3,5	0,77	4,8		0,84	
THR	6,7		5,4	0,85	7,6	1,20	5,6	0,89		
TRP	3,7	1,11	3,2		3,2		3,3			
TYR	3,5		2,6	<u>0,70</u>	5	1,39	3,4		1,15	
VAL	8,7		10,8	1,30	6,5	0,78	7,2	0,87	1,13	
phob'	63,1	1,13	69,4	1,17	51,4	0,84	49,5	0,86	1,13	
phil''	8,9	<u>0,55</u>	7,6	<u>0,50</u>	23,7	1,32	23,8	1,63		
amp'''	14,0	<u>0,61</u>	11,9	<u>0,61</u>	29,1	1,22	26,7	1,55		

*[93], ** A1, A2, ..., s. Formel 4, *** P1, P2, ..., s. Formel 5. Nur Werte mit $\pm 10\%$ Abweichung vom Erwartungswert sind gelistet. Die unterstrichenen bzw. fettgedruckten Werte sind **25 % häufiger** bzw. **25 % seltener** als der Erwartungswert. 'Hydrophob: Leu, Val, Met, Phe, Ala, Ile, Trp, ''Hydrophil: His, Gln, Asn, Glu, Lys, Asp, Arg (s. Tabelle 8), '''Amphiphil: Trp, Tyr, Gln, Glu, Lys, Arg, [135].

Die Einflüsse der unterschiedlichen Milieus spiegeln sich an der drastischen Bevorzugung hydrophiler und amphiphiler Aminosäuren besonders auf der Solventseite der Helixenden wider: Fast ein Viertel der Reste gehören dieser Gruppe an. Das sind dreimal so viele wie in den TM-Helix Abschnitten. In den TM-Helices sind diese Verhältnisse praktisch ausgeglichen.

Der Vergleich der Aminosäurepräferenzen für eine „versteckte“ (im Proteininnern) oder „exponierte“ (an der Proteinoberfläche) Position ($HH_{lip, pol} / HS_{lip, pol}$), lieferte 13 Aminosäuren mit deutlichen Kontaktpräferenzen, welche auf vier Gruppen verteilt werden konnten (Tabelle 12). Geeignete Aminosäuren zur Unterscheidung zwischen HH und HS Kontakten sind demnach: His, Thr, Tyr (**a**; „immer versteckt“) und Lys, Arg (**b**; „immer exponiert“). Cys, Asn und Ser sind „nur im Zentrum der Membran versteckt“, Phe, Gly, Asn, Gln und Ser sind „nur im Übergangsbereich zum wässrig-polaren Milieu exponiert“ (**c**). Ile und Leu sind „nur im Zentrum der Membran häufiger exponiert“ (**d**).

Tabelle 12: Aminosäuren helikaler Transmembrandomänen nach Kontaktpräferenzen geclustert



a) 18,7% der Aminosäurekontakte liegen „immer im Proteininnern“ b) 1,3% der Aminosäurekontakte sind „immer exponiert“ c) 30,8% der Aminosäurekontakte liegen „nur im Zentrum der Membran im Proteininnern“ d) 23,5% der Aminosäuren sind „nur im Zentrum der Membran exponiert“.

3.4.1.2 Packungsdichte helikaler Membrandomänen

Die Packungsdichte der Helices der verschiedenen Membranproteinstrukturen nimmt mit abnehmendem Cut Off zu. Sie variiert bei Cut Off = 0 Å insgesamt von 0,63 (1msl) bis 0,78 (1jb0). Dicht gepackte Strukturen [194] (Cut off = 0 Å, Atomdichte $\geq 0,73$) sind allerdings eher selten und nur beim Bakteriorhodopsin, beim Photosystem I und beim Lichtsammelnden Komplex zu finden (Auflösungen 1,6-2,5 Å). Mäßig gepackt (0 Å, Atomdichte 0,70-0,72) sind die TM-Abschnitte des Photosynthetischen Reaktionszentrums, des Lichtsammelnden Komplexes III und der Cytochrom C Oxidase (1ehk) (Auflösungen 2,2-3,0 Å). Der Großteil der Strukturen ist eher schlecht gepackt (0 Å, Atomdichte $< 0,7$, Auflösungen 2,2-3,5 Å). Der durchschnittliche Wert beträgt bei Cut Off 0 Å, 0,69.

Tabelle 13: Packungsdichte α -helikaler Membrandomänen in Abhängigkeit vom gewählten Cut Off

Helikale Membran- proteine	Auflö- sung	PDB- Code	Durchschnittliche Atomdichte bei Cut Off			
			1 Å	0,5 Å	0 Å*	-0,5 Å
1) Bakteriell es Rhodopsin						
Bakteriorhodopsin	1,6	1c3w	0,71	0,73	0,73	0,77
Halorhodopsin	1,9	1e12	0,67	0,68	<u>0,69</u>	0,73
Sensory Rhodopsin	2,4	1jgj	0,65	0,66	<u>0,67</u>	0,72
2) G-Protein gekoppelter Rezeptor						
Rhodopsin	2,8	1f88	0,65	0,66	<u>0,67</u>	0,73
3) Photosynthetisches Reaktionszentrum						
	2,2	1qov	0,70	0,71	0,71	0,73
	2,2	1eys	0,70	0,70	0,72	0,72
	2,3	1prc	0,69	0,70	0,70	0,72
4) Photosystem 1						
	2,5	1jb0	0,77	0,77	0,78	0,80
5) Bakterieller Lichtsammelnder Komplex						
Komplex II	2,4	1kzu	0,73	0,73	0,74	0,86
	2,5	1lgh	0,72	0,72	0,73	0,79
Komplex III	3,0	1ijl	0,69	0,69	0,71	0,77
6) Cytochrome c Oxidase / Atmungskomplex IV / Ubiquinol Oxidase						
Cytochrom C Oxidase	2,4	1ehk	0,69	0,70	0,71	0,74
Ubichinol Oxidase	3,5	1fft	0,64	0,65	<u>0,66</u>	0,68
7) Cytochrome bc1 / Atmungskomplex III						
Cytochrom bc1	3,0	1be3	0,63	0,64	<u>0,65</u>	0,67
	3,2	1bcc	0,65	0,66	<u>0,67</u>	0,69
	2,3	1ezv	0,63	0,63	<u>0,65</u>	0,71
8) Fumaratreduktase/ Succinat e dehydrogenase / Atmungskomplex II						
	3,3	1fum	0,65	0,66	<u>0,68</u>	0,70
	2,2	1qla	0,66	0,66	<u>0,68</u>	0,74
9) Kalium Kanal						
	2,8	1jvm	0,62	0,64	<u>0,64</u>	0,67
10) Mechanosensitiver Ionenkanal						
	3,5	1msl	0,59	0,60	<u>0,63</u>	0,66
11) Aquaporine und Verwandte						
Glycerol Facilitator	2,7	1fx8	0,66	0,66	<u>0,68</u>	0,74
13) P- type ATPase						
	2,6	1eul	0,65	0,66	<u>0,66</u>	0,68

*Atomdichte (Cut Off: 0 Å) $\geq 0,73$, = **dicht gepackt**, z. B. **0,76**.

Atomdichte (Cut Off: 0 Å) $< 0,70$, = **schlecht gepackt**, z. B. **0,71** [230].

3.4.1.3 Atomzusammensetzung der Kontaktflächen helikaler Membrandomänen

Auf Grund der idealisierten Packung der modellierten Außenflächen, werden die Kontakte der Hauptkettenatome dort methodisch etwas stärker betont [93]. Die Hauptkettenatome besitzen deshalb auf der Solventseite einen höheren Anteil an den Kontakten. Diese Differenz ist aber bei den TM-Helices und deren Enden nicht ganz so deutlich ausgeprägt (11/25), wie bei den Helices globulärer Proteine (12/32). Im Vergleich zu den globulären Proteinen (5 %) ist der Anteil polarer Kontakte der Hauptkettenatome zwischen den TM-Helices (1 %) verschwindend gering. Häufiger sind dafür, besonders innerhalb der Membran die C α -Kontakte (7 %).

Insgesamt ist die Atomzusammensetzung der verschiedenen Helix-Helixkontaktypen unabhängig vom Milieu praktisch gleich. Der Anteil der Atomkontakte polarer Seitenketten zum umgebenden Milieu ist aber bei den TM-Helixenden um 50 %, bei den TM-Helices sogar um 75 % niedriger, als der entsprechende Anteil bei globulären Proteinen. Dementsprechend werden bei den TM-Helices im Proteininnern doppelt so viele polare Kontakte wie Außen gefunden. Für die Helices globulärer Proteine verhält es sich genau umgekehrt.

Der Anteil polarer Atomkontakte der TM-Helices liegt mit insgesamt 26 % dann auch relativ niedrig (11 % und 15 %). Bei den Helices globulärer Proteine ist dagegen die Hälfte aller Atomkontakte polar. Die „abgeschnittenen“ Enden der Membranhelices liegen mit 35 % polaren Atomkontakten in etwa zwischen diesen beiden.

Tabelle 14: Atomzusammensetzung helikaler Kontaktflächen in Membranproteinen und wasserlöslichen globulären Proteinen

Cut off = 0 Å		TM-Helix		TM-Helixende		*Helix globulärer Proteine	
		HH _{lip} %	HS _{lip} %	HH _{pol} %	HS _{pol} %	HH %	HS %
Hauptkettenatome	C	3	5	3	5	2	7
	N	0	3	0	3	2	4
	C α	7	10	6	9	5	10
	O	1	7	1	8	3	11
	total	11	25	10	25	12	32
	polar	1	10	1	11	5	15
Seitenkettenatome	C	78	70	77	64	77	49
	N	6	2	7	6	5	8
	O	4	3	5	6	6	11
	S	1	1	1	0	1	0
	total	89	75	90	76	88	68
	polar	10	5	12	11	11	19
alle		100	100	100	100	100	100
	polar	11	15	13	22	16	34

Um die Datenmenge, der nur wenige Aminosäure langen TM-Endstücke sicher zu stellen wurden mehrere z. T. auch näher verwandte Strukturen verwendet (s. a. Tabelle 3). Der Datensatz ist wie folgt: 1c3w, 1e12, 1jgj, 1f88, 1aig, 1eys, 1ijd, 1ehk, 2occ, 1fft, 1be3, 1bcc, 1fum, 1qla, 1jym, 1msl, 1fx8, 1eul. *[93]

3.4.2 Diskussion

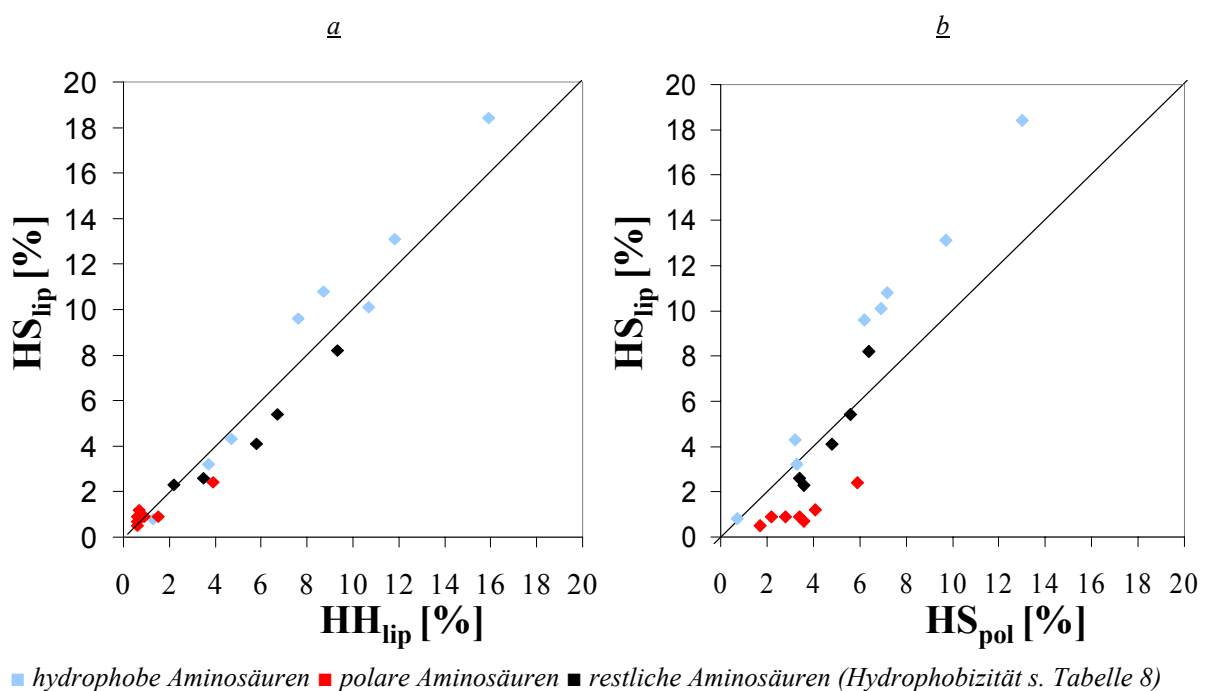
3.4.2.1 *Polare Wechselwirkungen helikaler Membrandomänen*

Die Präferenzen der meisten Aminosäuren α -helikaler Membrandomänen ändern sich deutlich, oder auch um ein Vielfaches beim Übergang vom lipophilen in das hydrophile Milieu (Tabelle 12c, d): Polare und amphiphile Aminosäuren sind innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht „versteckt“, im wässrig-polaren Milieu aber exponiert (Abbildung 48b). Neben dieser „longitudinalen Polarität“ existiert auch eine, wenn auch deutlich schwächere „transversale Polarität“ (Abbildung 48a). Diese wird auf Grund der zumeist kleineren Unterschiede, besonders bei Relation der beiden Präferenzen deutlich (Tabelle 12).

Der absolute Anteil polarer Wechselwirkungen liegt im Proteininnern unabhängig vom Umgebungsmilieu bei 10-12%. Nahezu jede TM-Helix ist daher im Schnitt über eine H-Brücke mit einer Nachbarhelix verbunden [219, 231]. Der Anteil polarer Seitenkettenatome an den TM-Helices ist im Proteininnern aber genau doppelt so hoch wie an der Proteinoberfläche. Bei den Helices globulärer Proteine liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Die kontrovers diskutierte [160] Theorie, wonach sich Membranproteine als „umgestülpte“ („inside-out“) wasserlösliche Proteine darstellen [232, 233] erhält zumindest von dieser Warte aus eine deutliche Bestätigung.

Dieser Blickwinkel wird überwiegend durch die vorgenommene Unterteilung der α -Helices in zentrale (TM-Helix) und terminale Bereiche (Helixende) fokussiert (Tabelle 14). An den Helixenden sind die exponierten Atome in Kontakt mit dem wässrig-polaren Milieu, weshalb dort der Anteil polarer Kontakte höher ist, ähnlich wie bei den Helices globulärer Proteine.

Abbildung 48: (a) Transversale und (b) longitudinale Polarität der Aminosäurenverteilung helikaler Membrandomänen



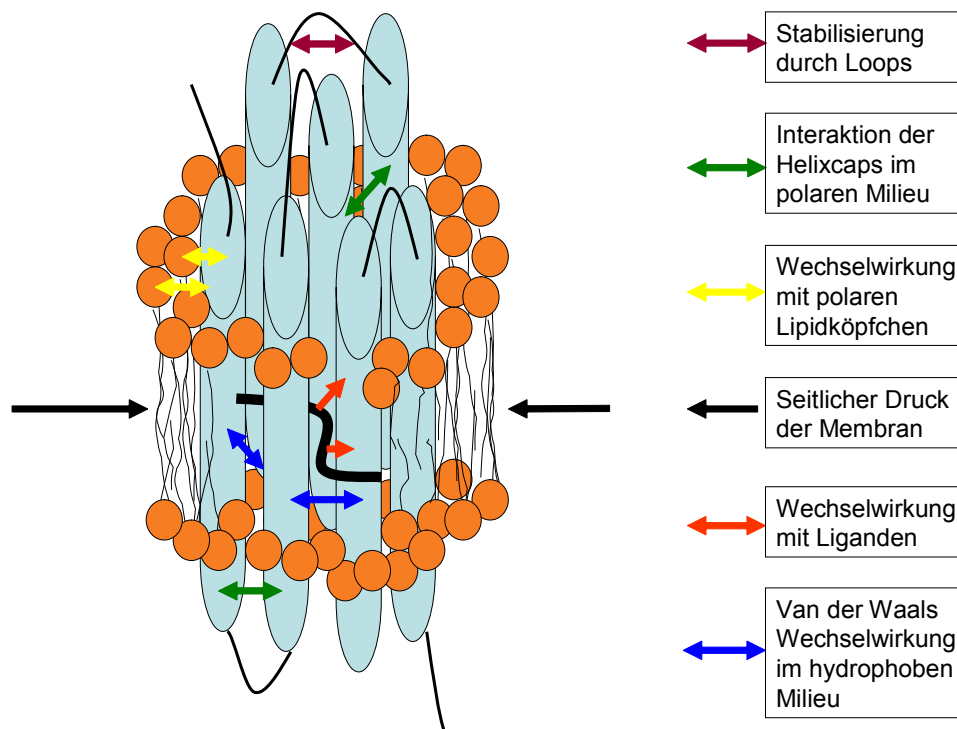
3.4.2.2 *Van der Waals Wechselwirkungen helikaler Membrandomänen*

Die Passform und die Kompatibilität der Kontaktflächen einander gegenüberliegender Sekundärstrukturen ist ein grundlegendes Merkmal aller Proteinwechselwirkungen [74, 75, 234]. Proteine sind daher in der Regel dicht gepackt ($\geq 0,73$). Das C-Atom hat im Proteininnern bei den hier untersuchten Sekundärstrukturen mit 84-89 % den höchsten Anteil an den Kontakten. Innerhalb der Membran existieren auf Grund der Abwesenheit des polaren Solvents aber keine „hydrophoben Wechselwirkungen“, weshalb diese Atome bei den TM-Helices nur durch relativ schwache Van der Waals Wechselwirkungen zur Proteinstabilität beitragen können [235].

Die durchschnittliche Packungsdichte der hier untersuchten TM-Helices von 0,69 ist vielleicht auch deshalb vergleichsweise niedrig und dürfte auch mit ansteigender Strukturgüte [236] (Auflösung) bei den Membranproteinen nur begrenzt zunehmen. Die relativ „lose Packung“ einiger TM-Domänen könnte außerdem, wie beim Mechanosensitiven Kanal die strukturelle Grundlage der Funktionstüchtigkeit vieler Proteine bilden [87, 161]. Nur wenige Membranproteine, wie z. B. das Bakteriorhodopsin (1c3w) sind wirklich dicht gepackt.

Die dielektrische Konstante beträgt im Bereich der polaren Lipidköpfchen mit 25-40 einen Wert, welcher dem der cytosolischen Umgebung bereits sehr nahe kommt [11] (Tabelle 1). Hydrophobe Atome sind daher an den Helixenden, wie bei den Helices globulärer Proteine überwiegend im Proteininnern zu finden. Der hydrophobe Effekt könnte daher die Assoziation der im polaren Milieu exponierten Helixenden erleichtern.

Abbildung 49: Mögliche Kräfte zur Stabilisierung eines Membranproteins

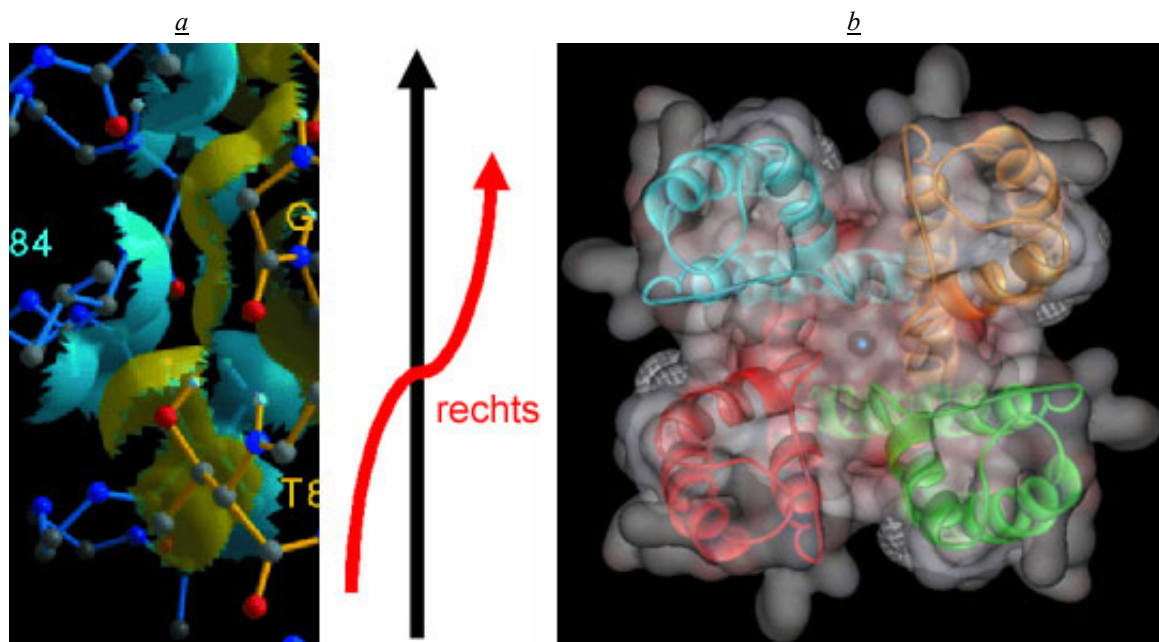


3.4.2.3 Kontaktpräferenzen einzelner Aminosäuren helikaler Membrandomänen

Die gefundenen Präferenzen korrelieren insgesamt sehr gut mit einigen bekannten Grundeigenschaften der Aminosäuren: Arg und Lys (Tabelle 12 b) werden v. a. im Übergangsbereich vom hydrophilen zum polaren Solvent, also an der Proteinoberfläche erwartet, wo die polaren Anteile der langen Seitenketten ins wässrige Milieu ragen [208]. Eine Abhängigkeit zwischen der Positionierung dieser Reste an den Termini von Modellpeptiden entsprechend der Periodizität der α -Helix und der Ausrichtung dieser Peptide in der ER Membran konnte bisher aber nur experimentell bewiesen werden [123].

Die polaren Seitenketten von Ser, Thr und Cys stabilisieren durch intrahelikale H-Brücken die Konformation der α -Helix innerhalb der Membran [237, 238]. Zusammen mit Asn tragen diese Aminosäuren durch Ausbildung interhelikaler H-Brücken fernerhin zur Stabilität der Tertiärstruktur bei [210, 239, 240]. Thr, Ser und Gly werden außerdem sehr häufig in dicht gepackten Motiven mit β -gegabelten Aminosäuren [218] oder Aromaten [231] gefunden, welche sehr häufig durch $C\alpha-H \cdots O$ H-Brücken stabilisiert sind (Abbildung 50). Der höhere Kontaktanteil der $C\alpha$ -Atome bei den Membranproteinen ist ein direkter Hinweis für das häufige Auftreten dieser Bindungen (Tabelle 14).

Abbildung 50: Helices mit negativen Kreuzungswinkeln in Glycophorin A und beim Kaliumkanal



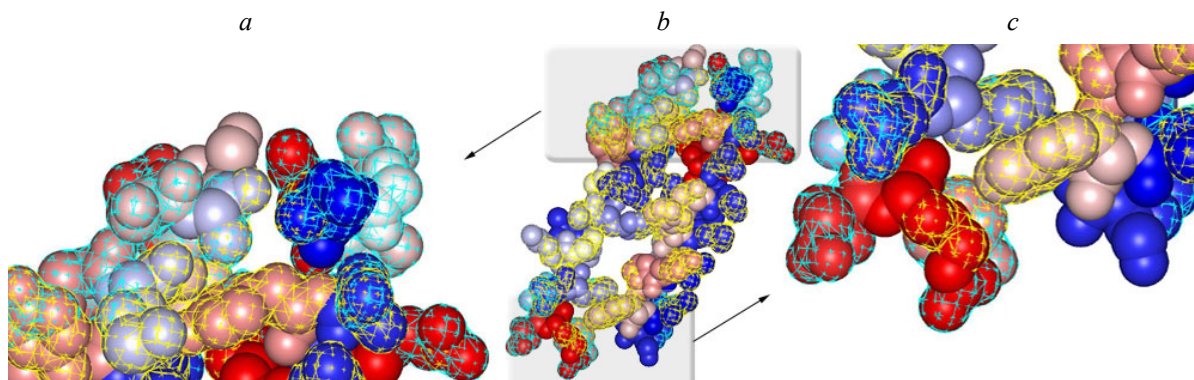
Bei dieser Variante kreuzen sich gerade Helices in größeren Winkeln von durchschnittlich -39° und jede 3,9-4te Aminosäure steht in Kontakt mit einer Aminosäure der Nachbarhelix. „Rechtshändige Superwindungen“ bilden daher die strukturelle Grundlage für die trichterförmige Gestalt des Kalium-, Chlorid und des mechanosensitiven Kanals [10]. **a)** Größere (Val, Ile; hellblau) und kleinere Aminosäuren (Gly, Thr; gelb) benachbarter Helices verzahnen zu dicht gepackten Interaktionsflächen im Homodimer des Glycophorin A Proteins [241]. **b)** Blick in den Trichter des Kaliumkanals mit Kaliummolekül im Zentrum (1jvm). Negative Kreuzungswinkel ermöglichen eine relativ starke Neigung der Helices zueinander, was für die Funktion vieler Kanalproteine essentiell ist.

Das Leu-Zippermotiv bildet die strukturelle Grundlage miteinander verdrehter Helices in sog. „Coiled coils“ fibrillärer Proteine und ist ebenfalls ein gängiges Strukturmerkmal helikaler Membranproteine [170, 242]. Die Helices kreuzen sich hier unter einem positiven Winkel. Jede 3,5te Aminosäure ist in einem solchen Motiv in Kontakt mit der Nachbar Helix. Die Eigenschaften jeder siebten Aminosäure ähneln sich deshalb, und man spricht von einem „Heptad Motiv“ [170]. Das hydrophile Leu, die häufigste Aminosäure mit den stärksten Kontaktanteilen, ist innerhalb der Lipiddoppelschicht häufiger exponiert, im wässrig-polaren Milieu aber eher versteckt.

Leu und Ala, welche die Konformation der Helix ebenso im wässrigen, wie im hydrophoben Milieu stabilisieren [145], stellen die Hälfte aller hydrophoben Reste in HH_{pol} dar. Die vergleichsweise häufigeren hydrophilen Aminosäuren (Glu, Gln, His Tabelle 10) sind zudem ausgezeichnete Helixbildner im wässrigen Milieu [243]. Während der Faltung zum Membranprotein könnten die Helixenden daher bereits im wässrigen Milieu in helikaler Konformation vorliegen, was für Modellpeptide bereits nachgewiesen wurde [88].

Überraschenderweise wurden keine Präferenzen für exponierte Seitenketten bei den Aromaten gefunden. Phe kommt überwiegend im hydrophoben Milieu vor, Tyr und His v. a. in wässrig-polarer Umgebung. Außer Trp, welches keine deutlichen Präferenzen zeigt, sind alle aromatischen Aminosäuren sogar bevorzugt in versteckten Positionen zu finden. Die „günstigen“ Wechselwirkungen des delokalisierten π -Elektronensystems mit den polaren Lipidköpfchen werden demnach zumindest in einigen Beispielen von noch günstigeren Wechselwirkungen im Proteininnern überlagert (Abbildung 51a). Aromatische Aminosäuren sind demgemäß besonders für die Ausrichtung der Sekundärstrukturen vor der Assoziation zur Tertiärstruktur von Bedeutung.

Abbildung 51: Protein- und Solvent- Kontakte von Helix 5 und 6 im Sensory Rhodopsin (1jgj)



Blick auf die Helix-Helix und Helix-Solvent Kontakte (ohne Loop) vom Innern des Proteins bei dem Cut off 0 Å. b) Helix- Helix- Kontakte (gelbes Netz) sind auch im Bereich der Helixenden zu finden, obwohl dort die Kontakte mit dem Solvent (blaues Netz) überwiegen. a, c) Die Detailansicht der Helixenden zeigt, dass sowohl hydrophobe (blau), als auch hydrophile (rot) Atome an den Aminosäurekontakten zwischen den Helices (gelbes Netz) beteiligt sind. Die Großzahl der hydrophilen Atome kontaktiert allerdings mit dem Solvent (blaues Netz).

3.5 Geometrie helikaler TM-Abschnitte

3.5.1 Ergebnisse

3.5.1.1 Die Hauptkettenwinkel (phi- und psi-Winkel)

Die Verteilung der Rotationswinkel um die N-C α (ϕ -Winkel) und die C α -C Bindung (ψ -Winkel) wurde für beide Datensätze in Form zweidimensionaler Diagramme dargestellt. [197] definiert unterschiedliche Regionen innerhalb des ϕ - ψ -Raums. Die rechtshändige α -Helix fällt in eine erlaubte Region des Ramachandran Plots, innerhalb derer alle Aminosäuren ideale Peptidgeometrie einnehmen.

In der Abbildung 52 a und b erscheinen die meisten Reste in dieser Region mit negativen ϕ - und ψ -Winkeln. Die Plots der beiden Datensätze kulminieren aber unterschiedlich und der Peak der TM- α -Helices ist in eine Region mit relativ höheren ϕ - und niedrigeren ψ -Winkel verschoben. In Tabelle 15 und Tabelle 16 sind die Torsionswinkel aller Strukturen und jeder einzelnen TM- α -Helix aufgelistet.

Abbildung 52: Ramachandran Plot von TM-Helices und langer Helices globulärer Proteine

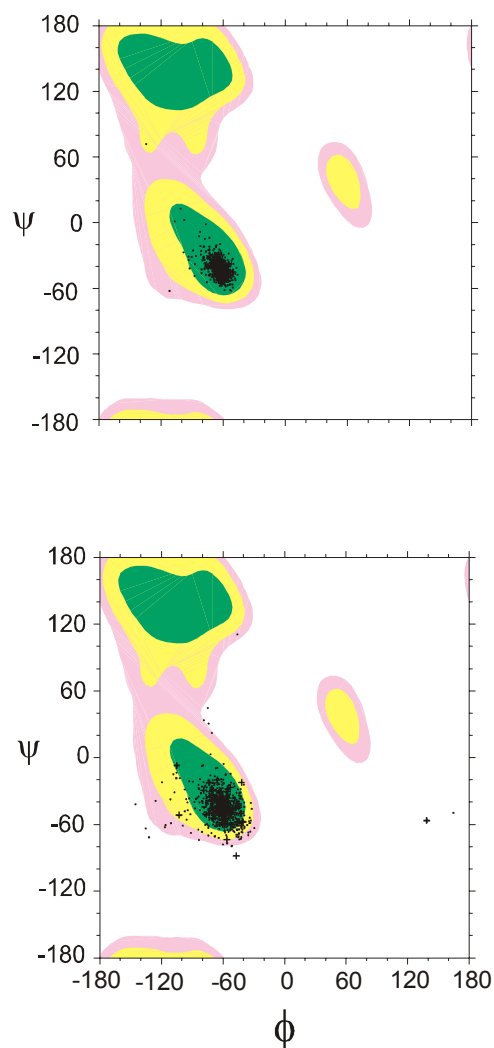


Abb. 31: a) Ramachandran Plot der ϕ - ψ -Winkel langer α -Helices globulärer Proteine. Die farblich gekennzeichneten Felder umschließen die gestaffelten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten dieser Winkel für die unterschiedlichen Sekundärstrukturtypen, errechnet aus einem Standarddatensatz globulärer Proteine [197, Koradi, 1996 #82]. Die Torsionswinkel der Aminosäuren der Referenzgruppe liegen im Zentrum der von α -Helices bevorzugten Region. Sie clustern in einem sehr engen Bereich um die Mittelwerte für $\phi = -64,6^\circ (\pm 0,5)$ und $\psi = -41,3^\circ (\pm 0,7; \text{Konfidenzintervall})$.

Abb. 31: b) Ramachandran Plot der ϕ - ψ -Winkel der α -helikalen TM-Abschnitte. Die Torsionswinkel streuen stärker in diesem Datensatz. Die häufige Aminosäure Gly (+) ist verstärkt in den äußeren Toleranzbereichen (gelb und rosa) der für α -Helices erlaubten Region zu finden und (vermutlich neben der i. A. schlechteren Auflösung der Membranproteinstrukturen) für die insgesamt stärkere Streuung mitverantwortlich. Einen weiteren Erklärungsansatz für diese breitere Verteilung bietet die Multifunktionalität der TM-Helices, welche Kanäle, Liganden Bindungsstellen, usw. mit einschließt. Die Mittelwerte der ϕ - ψ -Winkel sind mit $-63,1^\circ (\pm 0,3)$ und $-42,9^\circ (\pm 0,4)$ signifikant zu relativ höheren ϕ - und niedrigeren ψ -Winkel verschoben. (Dieser Plot wurde mit dem Programm MOLMOL [244] erstellt.

Tabelle 15: Torsionswinkel der verwendeten helikalen TM-Abschnitte

1be3	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	C	32 48	-56,5	-50,7	3,86	3,21	17
	C	85 103	-63,1	-40,7	0,76	0,21	19
	C	112 128	-60,7	-42,8	1,82	0,50	17
	C	184 200	-59,8	-41,5	2,25	0,05	17
	C	227 242	-62,1	-42,6	1,16	0,43	16
	C	290 305	-59,1	-45,5	2,20	1,24	16
	C	323 338	-58,8	-44,4	2,66	1,00	16
	C	351 370	-59,2	-47,4	2,66	2,15	20
	D	205 220	-64,2	-41,6	0,18	0,08	16
	E	39 58	-59,9	-45,9	2,25	1,59	20
	G	42 59	-60,7	-47,8	1,75	2,09	18
	J	20 38	-56,0	-51,2	4,26	3,50	19
	K	24 34	-58,7	-55,3	2,03	3,4	11*
			-60,1	-45,3	6,6	4,41	18

3.5.1

1j00	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	A	72 95	-63,7	-41,8	0,53	0,19	24
	A	159 177	-61,2	-43,9	1,71	0,91	19
	A	196 215	-65,1	-44,4	0,25	1,09	20
	A	391 410	-60,8	-45,0	1,93	1,33	20
	A	298 312	-59,6	-45,5	2,16	1,27	15
	A	356 375	-66,0	-40,4	0,72	0,34	20
	A	443 467	-62,1	-43,0	1,36	0,67	25
	A	536 554	-63,6	-42,2	0,50	0,30	19
	A	594 613	-64,0	-42,0	0,34	0,24	20
	A	671 689	-64,1	-39,5	0,24	0,65	19
	A	729 747	-62,7	-45,7	0,94	1,57	19
	B	46 68	-61,7	-42,6	1,58	0,48	23
	B	134 153	-63,4	-41,6	0,63	0,09	20
	B	174 195	-64,2	-45,1	0,24	1,37	22
	B	272 286	-61,9	-42,7	1,19	0,43	15
	B	335 353	-64,5	-43,4	0,06	0,72	19
	B	371 391	-64,7	-41,5	0,04	0,06	21
	B	420 447	-61,9	-45,6	1,50	1,68	28
	B	523 541	-66,6	-40,7	0,97	0,23	19
	B	582 600	-64,3	-40,9	0,16	0,15	19
	B	650 670	-65,1	-38,7	0,27	0,99	21
	B	710 731	-62,4	-45,2	1,47	1,53	22
	F	64 83	-61,4	-45,3	1,63	1,46	20
	I	12 25	-66,2	-39,8	0,58	0,41	14
	J	11 29	-61,7	-44,2	1,44	1,02	19
	L	45 63	-62,5	-41,5	1,0	0,1	19
	L	76 93	-63,3	-42,4	0,63	0,37	18
	L	121 139	-65,1	-42,1	0,21	0,27	19
	M	9 25	-63,0	-40,3	0,76	0,34	17
	X	14 31	-57,7	-47,4	3,24	2,05	18
			-63,1	-42,9	3,65	2,77	20

1kpk	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	C	36 59	-65,7	-43,2	0,53	0,73	24
	C	81 97	-57,5	-44,7	3,10	1,05	17
	C	127 140	-61,0	-47,3	1,49	1,74	14**
	C	150 159	-58,6	-49,0	1,94	1,76	10
	C	177 189	-62,7	-45,8	0,73	1,22	13
	C	194 201	-67,7	-46,7	0,77	0,98	8**
	C	217 232	-59,0	-45,9	2,47	1,44	16
	C	255 276	-58,3	-47,7	3,12	2,25	22
	C	291 308	-62,4	-41,2	1,00	0,05	18
	C	332 350	-54,1	-49,5	5,01	2,83	19
	C	361 378	-61,5	-46,8	1,41	1,79	18
	C	387 397	-64,0	-41,1	0,20	0,06	11**
	C	405 413	-55,4	-49,9	3,14	2,10	9**
	C	422 434	-64,3	-46,4	0,12	1,31	13**
			-60,6	-45,9	5,58	4,79	16

1msl	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	A	19 38	-55,4	-46,4	4,40	1,74	20
	A	72 88	-58,3	-48,2	2,97	2,30	17
			-56,8	-47,3	2,91	1,90	19

1jvm	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	A	29 46	-52,4	-54,7	5,86	4,60	18
	A	91 110	-56,4	-48,5	4,16	2,60	20
			-54,5	-51,5	13,40	3,47	19

1fx8	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	A	10 28	-66,6	-41,0	0,96	0,12	19
	A	41 59	-63,7	-41,6	0,46	0,10	19
	A	68 76	-66,4	-38,6	0,56	0,62	8**
	A	85 105	-63,8	-42,4	0,40	0,41	21
	A	148 166	-64,4	-41,6	0,09	0,10	19
	A	178 195	-65,5	-38,6	0,38	0,90	18
	A	204 213	-61,9	-41,9	0,93	0,13	10**
	A	233 251	-62,1	-44,5	1,09	1,00	19
			-64,4	-41,4	0,33	0,09	18

1eul	TM-Abschnitt		ϕ	φ	T-Test#		L
	A	51 68	-64,2	-40,2	0,19	0,36	18
	A	91 107	-62,1	-42,1	1,19	0,26	17
	A	257 271	-66,5	-39,7	0,75	0,47	15
	A	298 305	-65,9	-43,8	0,41	0,57	7**
	A	761 777	-62,2	-46,6	1,09	1,71	17
	A	790 805	-57,7	-45,8	2,82	1,31	16
	A	833 850	-66,5	-47,2	0,78	1,79	18
	A	904 907	-69,1	-38,3	1,02	0,50	3**
	A	933 946	-60,5	-46,2	1,76	1,48	14**
	A	968 985	-66,7	-38,1	0,83		18
			-63,6	-43,2	1,21	1,61	17

Tabelle 16: Torsionswinkel der verwendeten helikalen TM-Abschnitte (Fortsetzung)

<i>Ic3w</i>	<i>TM-Abschnitt</i>		ϕ	φ	<i>T-Test</i> #		<i>L</i>	
	A	12	27	-65,8	-40,5	0,54	0,27	16
	A	43	58	-66,2	-40,6	0,68	0,23	16
	A	80	95	-65,4	-37,1	0,33	1,28	16
	A	106	123	-65,2	-41,0	0,41	0,34	18
	A	138	153	-63,2	-39,6	0,63	0,55	16
	A	171	186	-64,9	-39,7	0,1	0,54	16
	A	206	224	-65,1	-42,8	0,16	0,47	19
				-65,0	-40,1	0,48	1,00	17

<i>Ilgb</i>	<i>TM-Abschnitt</i>		ϕ	φ	<i>T-Test</i> #		<i>L</i>	
	A	20	38	-65,0	-39,1	0,16	0,80	19
	B	21	39	-63,3	-41,7	0,68	0,13	19
				-64,1	-40,4	0,72	0,93	19

<i>Iglu</i>	<i>TM-Abschnitt</i>		<i>φ</i>	<i>φ</i>	<i>T-Test#</i>		<i>L</i>	
	C	28	47	-63,3	-43,0	0,68	0,61	20
	C	80	96	-64,1	-43,1	0,27	0,62	17
	C	126	145	-63,9	-43,6	0,38	0,83	20
	C	168	189	-65,1	-42,2	0,22	0,32	22
	C	209	228	-63,9	-42,6	0,39	0,47	20
	F	28	47	-63,2	-43,0	0,72	0,63	20
	F	80	96	-64,3	-42,9	0,15	0,54	17
	F	126	147	-64,1	-43,0	0,28	0,61	22
	F	168	189	-64,8	-42,4	0,09	0,39	22
	F	209	228	-63,8	-42,7	0,43	0,49	20
				-64,0	-42,8	0,92	1,70	20

<i>Ialg</i>	<i>TM-Abschnitt</i>			ϕ	φ	<i>T-Test</i> #		<i>L</i>
	P	13	29	-65,9	-39,8	0,59	0,49	17
	N	34	51	-69,3	-39,3	2,12	0,65	18
	N	86	100	-67,5	-39,4	1,25	0,61	15
	N	119	136	-68,0	-37,4	1,47	1,24	18
	N	170	187	-67,0	-38,3	1,10	1,02	18
	N	234	250	-69,6	-38,1	2,24	1,05	17
	O	57	74	-70,6	-37,5	2,71	1,23	18
	O	115	130	-64,3	-42,1	0,13	0,27	16
	O	147	164	-64,7	-41,1	0,04	0,08	18
	O	199	217	-69,0		2,08	1,73	19
	O	270	285	-67,6	-38,9	1,37	0,84	16
				-67,5	-39,0	4,15	2,42	17

Iacc	TM-Abschnitt	ϕ	φ	T-Test#	L
	A 18 38	-62,8	-41,3	0,99 0,01	21
	A 57 77	-64,6	-47,6	0,03 2,23	21
	A 100 117	-60,5	-43,2	1,88 0,62	18
	A 143 163	-65,2	-40,2	0,29 0,43	21
	A 187 208	-65,3	-39,4	0,33 0,70	22
	A 234 254	-63,5	-39,8	0,60 0,55	21
	A 272 282	-63,6	-44,2	0,39 0,82	11
	A 306 325	-64,4	-40,2	0,14 0,41	20
	A 338 357	-64,8	-41,0	0,09 0,13	20
	A 373 392	-65,2	-40,9	0,24 0,13	20
	A 410 426	-63,3	-43,8	0,64 0,83	17
	A 454 471	-61,6	-40,9	1,46 0,15	18
	B 27 46	-63,2	-42,1	0,73 0,28	20
	B 61 75	-65,8	-37,3	0,50 1,23	15
	C 17 35	-63,3	-42,1	0,70 0,30	19
	C 42 54	-60,2	-45,5	1,90 1,28	13
	C 83 98	-62,3	-41,1	1,05 0,08	16
	C 129 145	-64,6	-40,5	0,01 0,29	17
	C 163 180	-61,3	-43,5	1,65 0,78	18
	C 198 216	-66,5	-39,4	0,94 0,71	19
	C 238 255	-62,3	-43,9	1,17 0,91	18
	D 78 99	-62,0	-41,3	1,45 0,01	22
	G 17 35	-62,5	-43,9	1,01 0,87	19
	I 17 34	-59,0	-46,5	2,80 1,83	18
	J 34 52	-59,7	-46,6	2,50 1,92	19
	K 14 32	-58,9	-48,5	2,91 2,62	19
	L 22 42	-62,7	-42,6	1,01 0,49	21
	M 16 34	-61,0	-46,1	1,82 1,73	19
		-62,8	-42,6	3,58 2,01	19

<i>Ij33</i>	<i>TM-Abschnitt</i>	ϕ	φ	<i>T-Test</i> #	<i>L</i>
	A 43 60	-65,6	-42,0	0,48 0,23	18
	A 77 92	-66,0	-42,0	0,60 0,21	16
	A 113 129	-69,9	-40,5	2,35 0,26	17
	A 157	-69,8	-37,7	2,19 1,09	20
	A 202 217	-63,7	-46,8	0,38 1,66	16
	A 258 277	-63,7	-45,1	0,45 1,33	20
	A 290 305	-62,0	-41,2	1,04 0,04	16
		-65,9	-42,3	1,36 0,80	18

*kurz aufgrund Ende α -Helix innerhalb der Membran

**kurze Helix endet im Kanal

T-Test im Vgl. mit Referenzdatensatz (Formel 9)

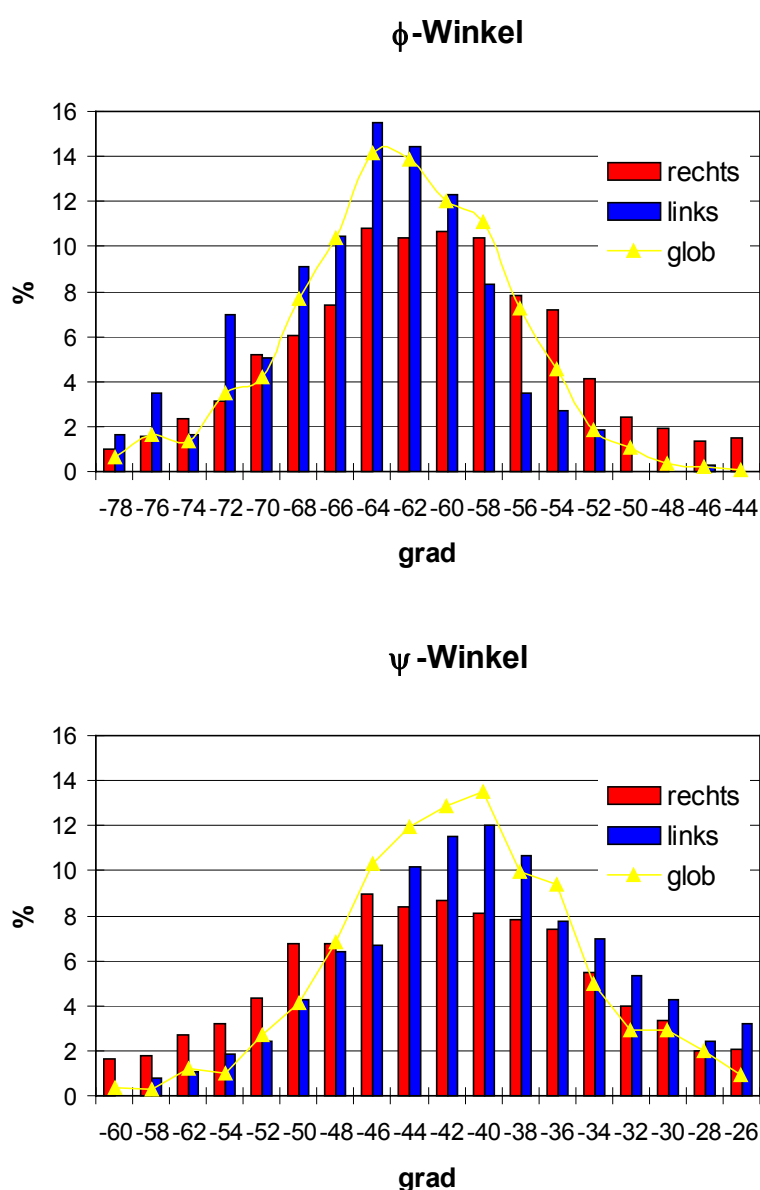
		ϕ	φ	<i>T-Test</i> #	<i>L</i>	
Gesamtmittelwert:		-63,1	-43,0	4,98	4,11	18,3

TM-links	-65,0	-41,3	0,31	0,33
TM-rechts	-59,6	-46,9	2,22	2,26

Mit Hilfe des Student Tests wurden die jeweiligen Unterschiede zum Referenzdatensatz auf Signifikanz beurteilt. 6 der 13 Membranproteinstrukturen sind für die insgesamt hochsignifikante Verschiebung der Torsionswinkel verantwortlich (Tabelle 6: rote ϕ - und ψ -Winkel).

Die Tertiärstrukturen der drei Membrankanäle, des Atmungskomplexes 3 und 4 und des Photosystems I werden überwiegend aus Helixkontakten mit negativen Kreuzungswinkeln geformt [10] (Abbildung 50). Diese Strukturen wurden deshalb zu einem Subdatensatz (**Kanäle, rechts**) zusammengefasst und in Abbildung 53 getrennt von den übrigen Membranproteinfamilien dargestellt. Jene zweite Gruppe (**Andere, links**) zeigt keine signifikanten Abweichungen und bildet v. a. linkshändige Helixkontakte („Supercoiling“).

Abbildung 53: Vergleich der relativen Verteilung der ϕ - und ψ -Winkel



Relative Verteilung der ϕ - und ψ -Winkel innerhalb der drei Datensätze langer α -Helices globulärer Proteine und vorwiegend rechts-, bzw. linksständiger TM-Helixkontakte. Der „rechts“ Datensatz ist sehr deutlich in Richtung größere ϕ - und kleiner ψ -Winkel verschoben.

Besonders auffällig ist diese signifikante Abweichung bei den Kanalproteinen (Mechanosensitiver Kanal, Kaliumkanal, Chloridkanal), welche den Hauptbestandteil dieses Subdatensatzes bilden.

Zur stärkeren Betonung der verwendeten Strukturfamilien wurde ein Mittelwert aus den durchschnittlichen ϕ - und ψ -Winkeln der Einzelstrukturen jedes Subdatensatzes errechnet: Die Werte betragen $-59,6^\circ$ und $-46,9^\circ$ für rechts- bzw. $-65,0^\circ$ und $-41,3^\circ$ für linkshändig gekreuzte Helices. Letztere weichen damit nicht vom Mittel langer globulärer Helices ($\phi, \psi = -64,6^\circ$ und $-41,3^\circ$) ab.

3.5.1.2 Die Seitenkettenwinkel (*chi 1*-Winkel)

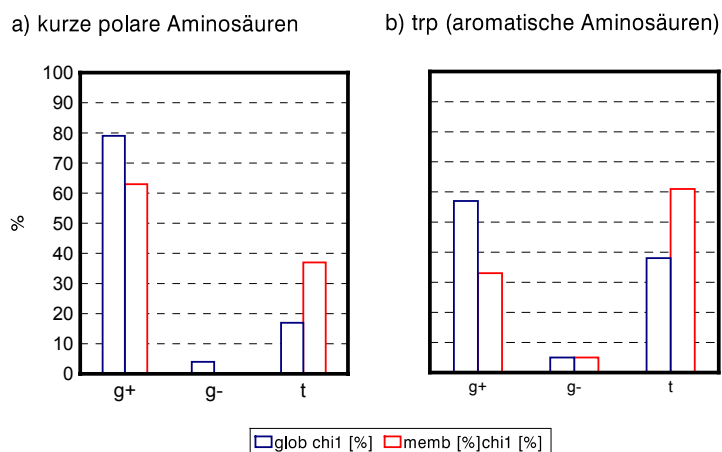
Die Konformation der Hauptkette wird durch die Art der Seitenkette, die Seitenkettenwinkel und die Umgebung (z. B. Milieu, benachbarte Aminosäuren) determiniert [245]. Für Aminosäuren wasserlöslicher globulärer Proteine wurde der aus Modellbausicht wichtige Zusammenhang zwischen den physikochemischen bzw. geometrischen Eigenschaften der Seitenkette (z. B. kurze Polare, Aromaten) und der Besetzung der Seitenkettenrotamere bereits früh nachgewiesen [196, 197].

Die Aminosäuren globulärer Proteine können deshalb zu fünf Gruppen ähnlicher Verzweigung, bzw. Polarität zusammengefasst werden. Innerhalb dieser Aminosäuregruppen stimmen dann die Werte der jeweiligen Hauptkettenwinkel pro Rotamer annäherungsweise überein [190]. In Abbildung 55 wird diese Korrelation und die Besetzung der drei Rotamere für die TM-Helices überprüft und mit denen in langen Helices globulärer Proteine verglichen.

Der Rotamer g^- ist in beiden Datensätzen erwartungsgemäß selten frequentiert. Die Korrelation der von den jeweiligen Aminosäuregruppen eingenommenen Seitenketten Rotamere und den dazugehörigen Hauptkettenwinkel ergibt beim Vergleich der beiden Datensätze aber eine Vielzahl signifikanter Unterschiede: Deutliche Verlagerungen sind bei den kurzen polaren Aminosäuren in g^+ und t , bei den Aromaten und den Aminosäuren ohne Verzweigung vor δ -Position in g^+ und g^- , bei Leu in g^+ und bei den β - verzweigten in g^- zu finden (Abbildung 55).

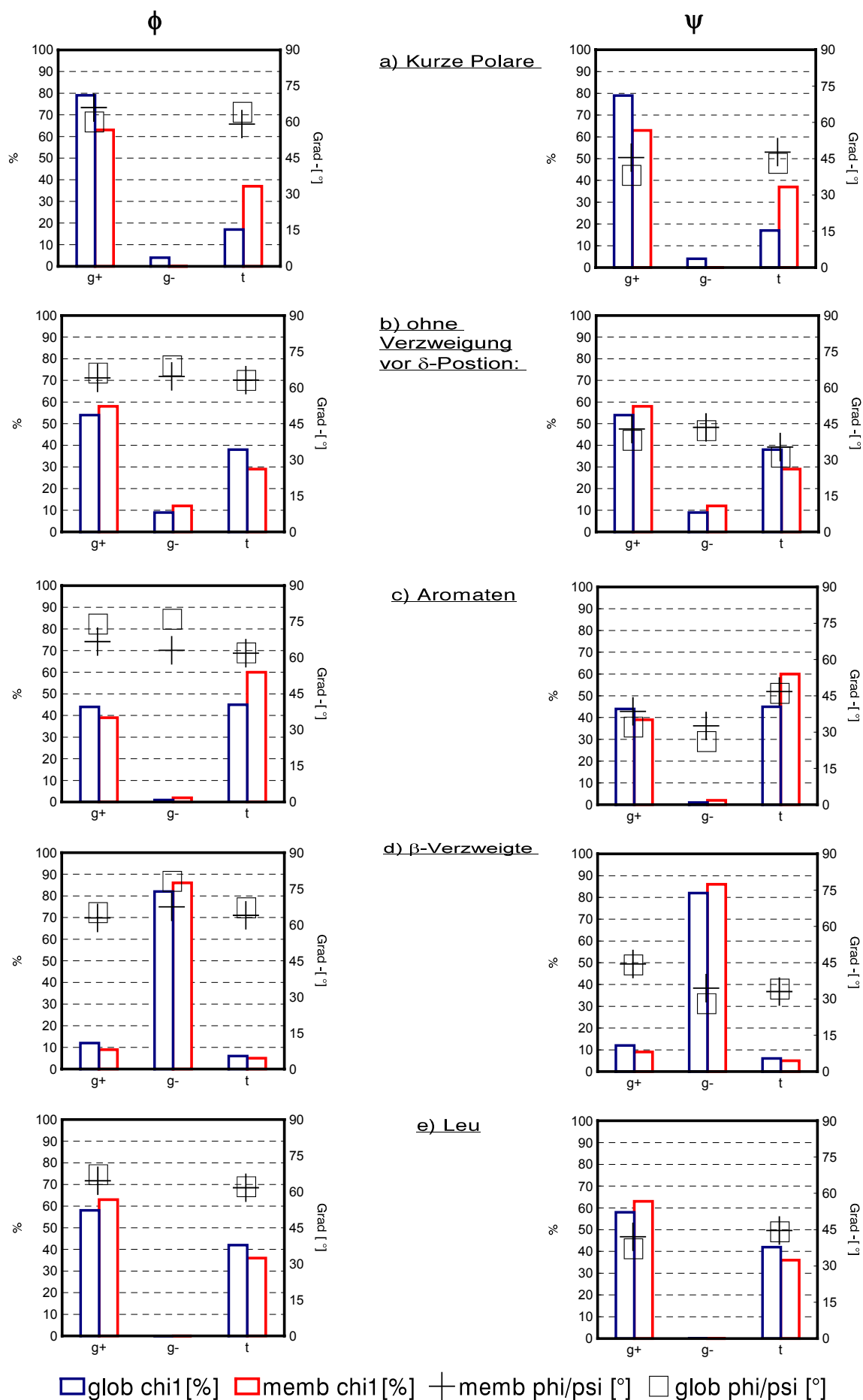
Signifikante Unterschiede wurden dabei für Trp, Tyr und Asp, Asn gefunden (Abbildung 54). Innerhalb der Membran ist der t Rotamer dieser Aminosäuren häufiger besetzt, der g^+ Rotamer seltener. Dieser bevorzugte Rotamer ist außerdem an der Ausbildung (im Betrag) niedrigerer bzw. höherer ϕ - und ψ - Torsionswinkel beteiligt und liefert somit eine erste Erklärung für die erwähnte Verschiebung der Hauptkettenwinkel bei den TM-Helices.

Abbildung 54: Unterschiedliche Besetzung von Seitenkettenrotameren in TM-Helices



a) Bei Asn und Asp bzw. beim **b)** Trp (und beim Tyr, nicht dargestellt) ist t im Datensatz der TM-Helices stärker besetzt und g^+ seltener, weshalb die ϕ - und ψ - Winkel bei diesen Aminosäuren im Vergleich zu Helices globulärer Proteine von -66° ; -38° auf -60° ; -46° bzw. -67° ; -39° auf -64° ; -43° verschoben sind.

Abbildung 55: Torsionswinkel unterschiedlich besetzter Seitenkettenrotamere



a) kurze polare Aminosäuren:

Bei Asn und Asp ist t in den TM-Helices signifikant stärker besetzt und g^+ seltener. Wie in den anderen Gruppen sind die ϕ - und ψ - Winkel der einzelnen Rotamere bei den TM-Helices im Vergleich zur Referenzgruppe zusätzlich jeweils leicht verschoben. Die ϕ - und ψ - Winkel betragen bei dieser Aminosäuregruppe für TM-Helices deshalb insgesamt -60° ; -46° im Vergleich zu -66° ; -38° für Helices globulärer Proteine.

b) Aminosäuren ohne Verzweigung vor δ -Position:

(Ser, Cys, Met, Glu, Gln, Lys, Arg) 12 % der Aminosäuren fallen in diese Gruppe (Tabelle 10). Die durchschnittlichen ϕ - und ψ Winkel zeigen mit -64° und -42° in TM-Helices und -65° und -39° im Referenzdatensatz die gleiche Tendenz, wie bei den übrigen Aminosäuregruppen.

c) Aromatische Aminosäuren:

(Trp, Tyr, Phe, His insgesamt 19,6 % der Aminosäuren) Die häufigere Besetzung von t und die Verschiebung der Hauptkettenwinkel bei g^+ in den TM-Helices bilden signifikante Unterscheidungsmerkmale zu den Helices globulärer Proteine. Die ϕ - und ψ - Winkel betragen für TM-Helices insgesamt -64° ; -43° , bei den globulärer Proteinen insgesamt -67° ; -39° .

d) β -verzweigte Aminosäuren:

Ile, Val und Thr sind sehr häufige Aminosäuren (zusammen 24,2 %) in den TM-Helices. 45 (9 %) der insgesamt 524 Reste sind in der g^- Konformation, welche bezüglich der ϕ - und ψ Winkel den größten Unterschied ($10,6^\circ$ und $6,4^\circ$) zwischen den beiden Datensätzen aufweist. Die ϕ - und ψ betragen insgesamt -63° und -43° in TM-Helices und -66° und -41° im Referenzdatensatz.

e) Leu:

Die Rotamere sind in beiden Datensätzen sehr ähnlich besetzt. Die mittleren ϕ - und ψ -Winkel betragen -63° und -43° in TM-Helices und -65° und -40° im Referenzdatensatz. Damit trägt auch die häufigste aller Aminosäuren (17,0 %, Tabelle 10) bei den TM-Helices zu der beschriebenen Verschiebung der Hauptkettenwinkel bei. Wie bei den meisten Aminosäuren ist nicht eine Umbesetzung der Seitenkettenrotamere, sondern die veränderte Korrelation zwischen den Haupt- und den Seitenkettenwinkel für diese Verschiebung verantwortlich.

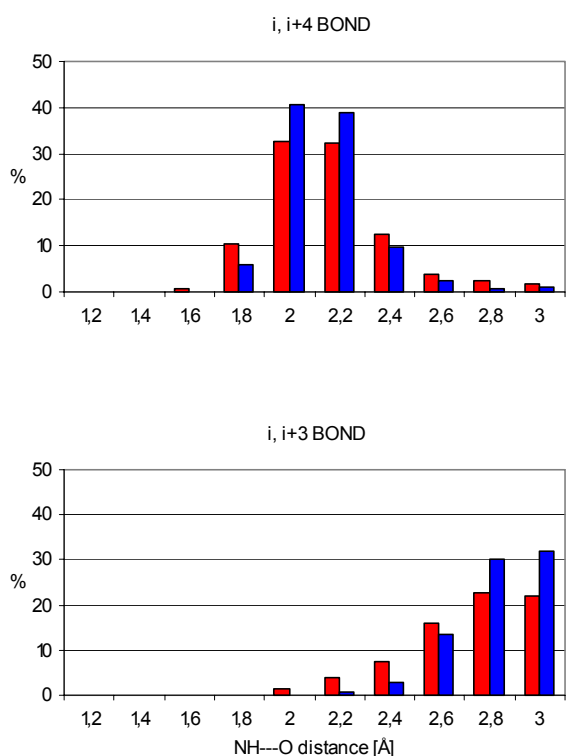
3.5.1.3 *I, i+4 Hauptkettenwasserstoffbrücken*

Für 95 %, oder 1697 aller TM-Reste und 99 %, oder 747 Reste langer Helices globulärer Proteine wurden $i, i+4$ H-Brücken nachgewiesen. 88 Reste, oder 5 % der Aminosäuren in den TM-Abschnitten sind in keine dieser für α -Helices typischen H-Brücken involviert. Die kürzeren und stabileren $i, i+4$ H-Brücken sind aber in den TM-Abschnitten zu finden: 11 % (33 % (!) in der einzigen Membranproteinstruktur mit atomarer Auflösung, 1c3w) der $C_i=O \cdots H-N_{i+4}$ Abstände in helikalen TM-Domänen sind kürzer als 1,8 Å, während nur 6 % der Reste in Helices globulärer Proteine solch kurze H-Brücken ausbilden. Die durchschnittliche Länge dieser Komponente ist in beiden Datensätzen mit 2,05 Å gleich.

3.5.1.4 *Gegabelte Hauptkettenwasserstoffbrücken*

Die Längen der $i, i+3$ H-Brücken sind in TM-Domänen analog der $i, i+4$ Komponente über ein breiteres Spektrum von Abständen verteilt, als in dem Referenzdatensatz (Abbildung 56). Nur 70 % aller Reste in TM-Helices (80 % derer globulärer Proteine) sind in die für 3_{10} -Helices typischen Wechselwirkungen involviert. Die $i, i+3$ H-Brücke ist bei Membranproteinen dann aber mit einem Durchschnittswert von 2,63 Å signifikant kürzer als beim Referenzdatensatz (2,74 Å). In TM-Helices wird der α -helikale Anteil demnach in $\frac{2}{3}$ der Helixpositionen durch eine dann vergleichsweise stärkere $i, i+3$ -Komponente unterstützt. Diese Komponente verblasst in den verbleibenden $\frac{1}{3}$ der Wechselwirkungen bei TM-Helices bzw. bei $\frac{1}{4}$ derer globulärer Proteine aber neben der in der Regel starken $i, i+4$ H-Brücke.

Abbildung 56: Gegabelte Wasserstoffbrücken in TM-Helices und Helices globulärer Proteine



Der Anteil kürzerer H-Brücken ist bei Membranproteinen für beide Komponenten höher. Etwa 193 der 1735 untersuchten $i, i+4$ Wasserstoffbrücken sind kürzer als 1,80 Å, das sind doppelt so viele wie für Helices globulärer Proteine. Die $i, i+4$ H-Brücke ist typisch für α -Helices, in beiden Datensätzen stärker ausgeprägt und im Durchschnitt 2,05 Å lang.

Die $i, i+3$ H-Brücke (typisch für 3_{10} -Helix) tritt bei dem gewählten Cut off von 3 Å (die elektrostatische Energie fällt langsam mit $1/r$, [203]) bei 70 % der TM-helikalen Reste auf und ist 2,63 Å lang. Dagegen sind 80 % der H-Brücken bei globulären Proteinen gegabelt. Die Durchschnittslänge beträgt 2,74 Å.

3.5.1.5 *pi-Helices und Knicke in den Membranhelices*

Molekulare Dynamik Simulationen belegen, dass der Übergang einer α - zur π -Helix durch die (in Membranproteinen häufig) übereinander liegenden Val oder Ile begünstigt wird [217]. In diesem Fall entsteht oft unter Beteiligung eines Gly, bzw. Pro ein π -Bulge, welcher wie im Beispiel der Helix G von Bakteriorhodopsin (Abbildung 44) durch β -verzweigte Aminosäuren in i, i+4 Position gesäumt wird [10]. π -Bulges sind lokale Abweichungen von der α -Helizität und durch i, i+5 anstelle von i, i+4 Wasserstoffbrückenbindungen ausgezeichnet (Abbildung 58). In Tabelle 17 werden diese Ausnahmen quantifiziert.

Etwas mehr als die Hälfte der 48 Pro in mittlerer Helixposition (in keiner der ersten vier Positionen des N-Terminus) verursacht einen Knick. Durch Prolin verursachte freie, d. h. nicht durch H-Brücken gesättigte $>C=O$ Gruppen, sind aber mögliche Wasserstoffbrückenbindungspartner für die beiden $>C^{\delta}-H$ Positionen. In Tabelle 17 ist die Anzahl der alternativer (**tatsächliche**/und mögliche) H-Brücken $>C^{\delta}-H \cdots O_{i-n}$ angegeben (Abbildung 45). In TM-Helices sind $\frac{3}{4}$ der $>C=O$ Gruppen in i-4- bzw. $\frac{2}{3}$ in i-3 Position weniger als 3 Å von dem $>C^{\delta}-H$ entfernt (Tabelle 17). Die Mittelwerte dieser gemessenen Distanzen betragen 2,6 und 2,7 Å, ein Wert, der ansonsten von der in dieser Position zu erwartenden $>N_i-H \cdots O=C_{i-3}<$ Wasserstoffbrücke eingenommen wird.

Ein Großteil des durch Prolin verursachten Defizits an Hauptkettenwasserstoffbrücken könnte demnach durch $>C^{\delta}-H \cdots O_{i-n}$ ausgeglichen werden. Die $>C^{\delta}-H \cdots O=C<$ dürfte aber auf Grund der geringeren Basizität der $>C^{\delta}-H$ im Vergleich zur $>N-H$ Gruppe aus energetischer Sicht etwas schwächer sein. Elektrostatische Wechselwirkungen sind aber innerhalb der Membran in der Regel stärker, was die Bedeutung solcher schwachen Bindungen für die Stabilität der TM-Helices wiederum betont.

Tabelle 17: Durch Pro verursachte geometrische Besonderheiten in den untersuchten TM-Helices:

Pdb-Code	<i>Anzahl Proline</i>		<i>Knick</i>		<i>π-bulge</i>	<i>Wasserstoffbrücken (s. o. Text)</i>		
	Ins.	Mitte	ja	nein	N	i,i+3	i,i+4	i,i+5
1be3	6	5	4	1	1	1/5	3/5	0/1
1lgh	1	0	-	-	-	-	-	-
1kpk	5	1	0	1	-	1/1	1/1	-
1c3w	1	1	1	0	-	1/1	1/1	-
1f88	6	5	3	2	2	3/3	3/5	1/2
1fx0	6	2	0	2	-	0/1	2/2	-
1jb0	5	3	0	3	1	1/1	2/3	1/1
2occ	13	11	7	4	3	5/5	7/10	1/2
1qla	2	0	-	-	-	-	-	-
1aig	3	1	1	0	1	0/1	1/1	-
alle	48	29	16	13	7	12/19	20/28	4/7

3.5.2 Diskussion

3.5.2.1 Korrelation der Haupt- und Seitenkettenwinkel helikaler TM-Abschnitte

Die Untersuchung der Torsionswinkel verweist auf eine Reihe signifikanter Unterschiede. Die festgestellte Verschiebung der ϕ - und ψ - Hauptkettenwinkeln lässt sich durch Teilen der Membranproteinstrukturen in zwei (bezüglich der Kreuzungswinkel der Helices) unterschiedliche Gruppen verschärfen. Hochsignifikante Abweichungen von ± 5 - 10° liegen bei den Vertretern der unterschiedlichen Kanalproteinfamilien vor, deren Helices sich überwiegend unter einem negativen Winkel kreuzen (Abbildung 50).

Die Seitenketten der Aminosäuren Tyr, Trp, Asn und Asp befinden sich innerhalb der TM-Abschnitte bevorzugt in *t*. Dieser signifikante Unterschied korreliert einerseits sehr gut mit der erwähnten Verschiebung der Hauptkettenwinkel (Abbildung 54), andererseits sind diese Aminosäuren mit Ausnahme von Asn viel häufiger im Datensatz der Kanalproteine und dort v. a. in dem Helix- Solvent Interface zu finden (o. Abbildung). Die restlichen Trp und Tyr, deren Seitenkettenrotamere in *t* vorliegen sind nahezu vollständig im Membran- Solventinterface, also an den Enden der TM-Helices positioniert.

Die dokumentierte Verschiebung der ϕ - und ψ - Winkel in TM-Helices könnte damit wenigstens z. T. auf die besondere Elektrostatik zurückzuführen sein, welche im Membran Interface oder an den Kanalwänden vorherrscht. Dafür spricht auch die gut dokumentierte Tatsache [246, 247], dass die Variabilität der Torsionswinkel mit der Solventzugänglichkeit in der Regel zunimmt. Neue, höher aufgelöste Membranproteinstrukturen, v. a. von Proteinkanälen, könnten die hier dokumentierten signifikanten Unterschiede weiter unterstreichen.

3.5.2.2 Wasserstoffbrückenbindungen bei helikalen TM-Abschnitten

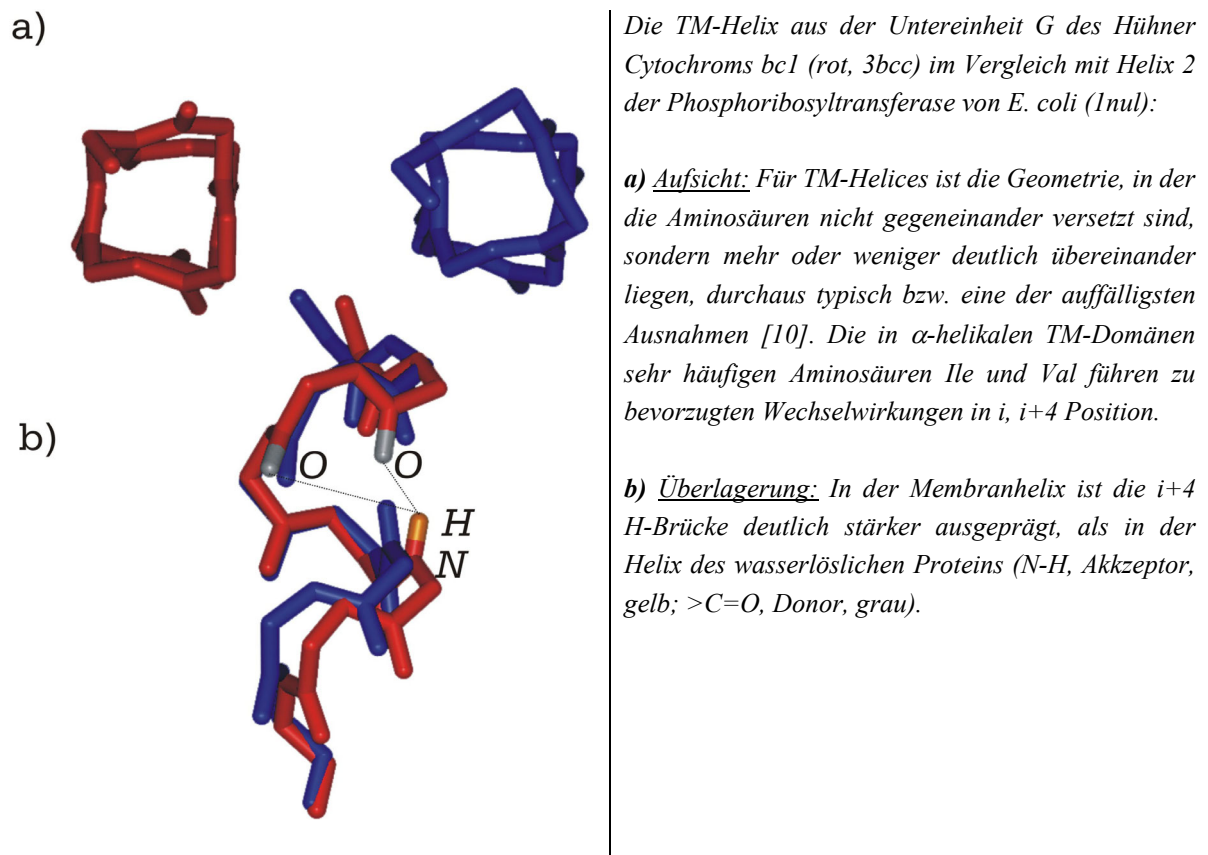
Im Gegensatz zur Verschiebung der Torsionswinkel wurden bei dieser Untersuchung auch bei den best aufgelösten Strukturen deutliche Unterschiede gefunden. Ein Drittel der für α -Helices typischen *i*, *i*+4 H-Brücken liegen beim Bakteriorhodopsin (1c3w) unterhalb einer Länge von $1,8 \text{ \AA}$, mehr als fünfmal so viele, wie bei langen α -Helices globulärer Proteine (Abbildung 57). Kürzere und damit stärkere Hauptkettenwasserstoffbrücken sind in α -Helices innerhalb des hydrophoben Milieus der Membran mit einer sehr niedrigen Dielektrizitätskonstante durchaus zu erwarten (Tabelle 1). Hinsichtlich der Proteinfunktion wichtige, aus energetischer Sicht zunächst aber ungünstige strukturelle Abwandlungen (Abbildung 58) könnten dadurch insgesamt ausgeglichen werden.

Die Verwendung der für Kanalproteine typischen ϕ - und ψ - Winkel (Abbildung 52) betont ebenfalls die *i*, *i*+4 Komponente, besitzt also die gleiche Tendenz. Die Übereinstimmung dieser beiden Untersuchungsparameter spricht dafür, dass die in dieser Arbeit gefundenen Abweichungen der Helixgeometrie membranspezifischer Natur und demnach kein Artefakt der Auflösung sind. Die deutliche Verschiebung der Korrelation der Haupt- und Seitenkettenwinkel einiger Aminosäuren könnte als eine Folge der geringen Auflösung der Strukturdaten, z. B. durch fehlerhafte Zuordnung der Seitenkettenrotamere, gewertet werden.

3.5.2.3 Vergleich mit der Aminosäurekomposition von helikalen TM-Abschnitten

Die Untersuchung der H-Brücken verweist demnach auf eine Reihe von Besonderheiten, die sich außerdem mit der Aminosäurekomposition von Membranproteinen in Übereinklang bringen lässt: Die große Präsenz β -verzweigter Aminosäuren führt zu einer Verringerung des Anteils der $i, i+3$ H-Brücken (Abbildung 57). In dieser Position werden in globulären Proteinen ohnehin große Reste mit flexiblen Seitenketten, wie Arg, Glu, Gln, oder hoher Asymmetrie wie das Trp gefunden [74]. Diese Aminosäuren sind entweder kaum in TM-Domänen vertreten (Tabelle 10), oder wie das Trp nur in wenigen Ausnahmen weit im Innern der Membran (z. B. in der Rhodopsin Bindungstasche, 1f88) zu finden. Ser und Thr werden aber in beiden Motiven gefunden und tragen zusammen mit Met zu der ebenfalls wichtigen $i, i+3$ H-Brücken Komponente in Membranproteinen bei (Abbildung 42 c).

Abbildung 57: Überlagerung einer TM-Helix mit der Helix eines globulären Proteins

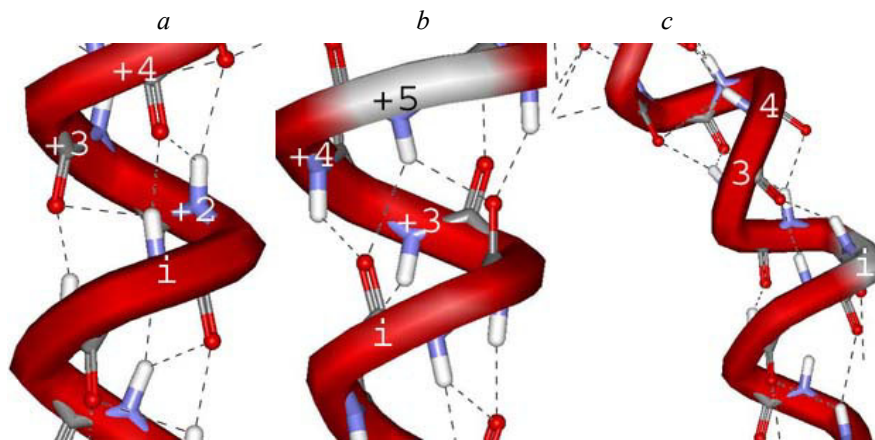


3.5.2.4 Geometrische Besonderheiten helikaler TM-Abschnitte

Der vergleichsweise höhere Anteil fehlender H-Brücken ist bei Membranproteinen größten Teils auf strukturelle Besonderheiten wie π -Helices (z. B. Helix 6 im Rhodopsin), 3_{10} -Helices (z. B. Atmungskomplex IV, A320-331 [50], oder Helix 5 und 7 im Rhodopsin, [42]) oder Knicke in den TM-Abschnitten zurückzuführen (Abbildung 46, Abbildung 58). Die bevorzugten Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Seitenketten in $i, i+4$ Position verstärken innerhalb der Membran die Tendenz zur α -Helixbildung [217]. Im Ausnahmefall kann aber die in der Regel schwächer ausgeprägte $i, i+3$ Komponente der 3_{10} -Helix durch die $i, i+5$ H-Brücke ersetzt werden, welche typisch für π -Helices ist.

Diese geometrischen Besonderheiten besitzen im Bakteriorhodopsin (Abbildung 44), oder der TM-Helix aus der Untereinheit VIa von der Rinder Cytochrome C Oxidase, funktionellen Charakter [179, 248]. In der H-Untereinheit des Photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* [249] ist derart Leu (30) als zusätzliche Aminosäure in die Helix eingefügt, welche in der homologen Region von *Rhodobacter sphaeroides* [43] fehlt. π -bulges sind demnach auch eine Möglichkeit lokal eine Aminosäureinsertionen zu realisieren, ohne die Staffelnung der restlichen Aminosäuren zu verändern [250]. Diese geometrischen Besonderheiten von TM-Helices sind demnach durch eng in der Sequenz benachbarte größtenteils hydrophobe und im Falle von Val β -Barrel typische Aminosäuren induziert.

Abbildung 58: Geometrische Besonderheiten helikaler TM-Abschnitte



a) Helix aus der L-Untereinheit des Photosynthetischen Reaktionszentrums (*lprc*) mit gegabelten i , $i+3$ und $i, i+4$ H-Brücken. **b)** π -Bulge Helix aus der Untereinheit H (*lprc*): Die Hauptkomponente $i, i+4$ bleibt bestehen, während die Nebenkompone von $i, i+3$ auf $i, i+5$ gewechselt ist. **c)** Typischer Knick in einer Helix aus der C-Untereinheit der Fumaratreduktase (*lqla*): Die $i, i+3$ Komponente bleibt in diesem Beispiel bestehen, während die $i, i+4$ Komponente verschwindet.

3.6 Zusammenfassung

Das Auffinden spezifischer Strukturmerkmale integraler Membranproteine ist eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Stabilität und Faltung und die notwendige Voraussetzung zur Modellierung ihrer Raumstruktur. Die Aminosäurezusammensetzung der innerhalb des hydrophoben Bereichs der Membranabschnitte befindlichen α -Helices wird entscheidend durch dieses Milieu determiniert, wie der Vergleich mit β -Barrel Membranproteinen und α -Helices globulärer Proteine zeigt. Die Untersuchung der ϕ -, ψ - und χ_1 -Winkel lieferte gleichwohl eine Reihe von signifikanten Besonderheiten welche speziell bei einigen polaren (Asn, Asp) bzw. aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr) deutlich miteinander korrelieren. Der Anteil kürzerer, der für α -Helices typischen $i, i+4$ Wasserstoffbrückenbindungen ist innerhalb der Membran insgesamt höher, was ebenfalls mit der Verschiebung der ϕ -, ψ -Winkel korreliert. Die Geometrie von α -Helices integraler Membranproteine ist damit näherungsweise ideal. An den Enden von Membranhelices und in den Helixturns werden neben Pro und Gly häufig polare, amphiphile oder aromatische Aminosäuren gefunden. Die polaren und amphiphilen Aminosäuren liegen überwiegend in den Helixturns und im Bereich der polaren Lipidköpfchen auf der Seite der Helix, welche der Membran zugewandt ist. Zur Fettschicht im Zentrum der Membran hin ragen umgekehrt vorherrschend lipophile Aminosäureseitenketten. Dieser Gradient ist folgerichtig auch an der Aminosäurezusammensetzung der Helixcaps erkennbar, welche die transmembranen Helices zumeist intra- und extrazellulär abschließen. Helixcaps α -helikaler Membrandomänen sind somit spezifische, von den klassischen Caps globulärer Proteine unterscheidbare Struktur motive. Die konsequente Trennung der Untersuchungen der α -helikalen Abschnitte innerhalb der hydrophoben Lipiddoppelschicht von den Helixenden im polar-wässrigen Milieu ermöglicht außerdem die Identifikation vieler Aminosäurepräferenzen für exponierte (Leu, Ile), oder verdeckte Positionen (Ser, Asn, Cys). Umgekehrt wie bei den α -Helices globulärer Proteine ist die Atomzusammensetzung der Solvent exponierten Aminosäureseitenketten im Zentrum der Membran doppelt so hydrophob wie im Proteininnern.

4 Literaturverzeichnis

- [1] Montelione, G. T. und Anderson, S. (1999): Structural genomics: keystone for a Human Proteome Project, *Nat Struct Biol* 6 [1], Seite 11-2.
- [2] Lee, G.; Dallas, S.; Hong, M. und Bendayan, R. (2001): Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations, *Pharmacol Rev* 53 [4], Seite 569-596.
- [3] von Heijne, G. (1996): Principles of membrane protein assembly and structure, *Prog Biophys Mol Biol* 66 [2], Seite 113-39.
- [4] Baleja, J. D. (2001): Structure Determination of Membrane-Associated Proteins from Nuclear Magnetic Resonance Data, *Anal Biochem* 288 [1], Seite 1-15.
- [5] Miller, C. (2001): See potassium run, *Nature* 414 [6859], Seite 23-4.
- [6] Berneche, S. und Roux, B. (2001): Energetics of ion conduction through the K⁺ channel, *Nature* 414 [6859], Seite 73-7.
- [7] Rosenbusch, J. P.; Lustig, A.; Grabo, M.; Zulauf, M. und Regenass, M. (2001): Approaches to determining membrane protein structures to high resolution: do selections of subpopulations occur? [In Process Citation], *Micron* 32 [1], Seite 75-90.
- [8] Preissner, R.; Goede, A.; Rother, K.; Osterkamp, F.; Koert, U. und Froemmel, C. (2001): Matching organic libraries with protein-substructures, *J Comput Aided Mol Des* 15 [9], Seite 811-7.
- [9] Gerstein, M. (1998): How representative are the known structures of the proteins in a complete genome? A comprehensive structural census, *Fold Des* 3 [6], Seite 497-512.
- [10] Popot, J. L. und Engelman, D. M. (2000): Helical membrane protein folding, stability, and evolution, *Annu Rev Biochem* 69, Seite 881-922.
- [11] Ashcroft, R. G.; Coster, H. G. und Smith, J. R. (1981): The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The dielectric structure of the hydrophilic/hydrophobic interface, *Biochim Biophys Acta* 643 [1], Seite 191-204.
- [12] Murzin, A. G.; Brenner, S. E.; Hubbard, T. und Chothia, C. (1995): SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures, *J Mol Biol* 247 [4], Seite 536-40.
- [13] Rosenbusch, J. P. (2001): Stability of membrane proteins: relevance for the selection of appropriate methods for high-resolution structure determinations, *J Struct Biol* 136 [2], Seite 144-57.
- [14] Weiss, M. S. und Schulz, G. E. (1992): Structure of porin refined at 1.8 Å resolution, *J Mol Biol* 227 [2], Seite 493-509.
- [15] Kreusch, A. und Schulz, G. E. (1994): Refined structure of the porin from *Rhodopseudomonas blautica*. Comparison with the porin from *Rhodobacter capsulatus*, *J Mol Biol* 243 [5], Seite 891-905.
- [16] Cowan, S. W.; Schirmer, T.; Rummel, G.; Steiert, M.; Ghosh, R.; Pauptit, R. A.; Jansonius, J. N. und Rosenbusch, J. P. (1992): Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins, *Nature* 358 [6389], Seite 727-33.
- [17] Cowan, S. W.; Garavito, R. M.; Jansonius, J. N.; Jenkins, J. A.; Karlsson, R.; König, N.; Pai, E. F.; Pauptit, R. A.; Rizkallah, P. J.; Rosenbusch, J. P. und et al. (1995): The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form, *Structure* 3 [10], Seite 1041-50.
- [18] Dutzler, R.; Rummel, G.; Alberti, S.; Hernandez-Alles, S.; Phale, P.; Rosenbusch, J.; Benedi, V. und Schirmer, T. (1999): Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*, *Structure Fold Des* 7 [4], Seite 425-34.

- [19] Zeth, K.; Diederichs, K.; Welte, W. und Engelhardt, H. (2000): Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution, *Structure Fold Des* 8 [9], Seite 981-92.
- [20] Meyer, J. E.; Hofnung, M. und Schulz, G. E. (1997): Structure of maltoporin from *Salmonella typhimurium* ligated with a nitrophenyl-maltotrioxide, *J Mol Biol* 266 [4], Seite 761-75.
- [21] Schirmer, T.; Keller, T. A.; Wang, Y. F. und Rosenbusch, J. P. (1995): Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution, *Science* 267 [5197], Seite 512-4.
- [22] Forst, D.; Welte, W.; Wacker, T. und Diederichs, K. (1998): Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose [see comments], *Nat Struct Biol* 5 [1], Seite 37-46.
- [23] Locher, K. P. und Rosenbusch, J. P. (1997): Oligomeric states and siderophore binding of the ligand-gated FhuA protein that forms channels across *Escherichia coli* outer membranes, *Eur J Biochem* 247 [3], Seite 770-5.
- [24] Ferguson, A. D.; Hofmann, E.; Coulton, J. W.; Diederichs, K. und Welte, W. (1998): Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide [see comments], *Science* 282 [5397], Seite 2215-20.
- [25] Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.; Chakraborty, R.; van der Helm, D. und Deisenhofer, J. (1999): Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli* [see comments], *Nat Struct Biol* 6 [1], Seite 56-63.
- [26] Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H. und Gouaux, J. E. (1996): Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science* 274 [5294], Seite 1859-66.
- [27] Pautsch, A. und Schulz, G. E. (1998): Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain, *Nat Struct Biol* 5 [11], Seite 1013-7.
- [28] Vogt, J. und Schulz, G. E. (1999): The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence, *Structure Fold Des* 7 [10], Seite 1301-9.
- [29] Snijder, H. J.; Ubarretxena-Belandia, I.; Blaauw, M.; Kalk, K. H.; Verheij, H. M.; Egmond, M. R.; Dekker, N. und Dijkstra, B. W. (1999): Structural evidence for dimerization-regulated activation of an integral membrane phospholipase, *Nature* 401 [6754], Seite 717-21.
- [30] Koronakis, V.; Sharff, A.; Koronakis, E.; Luisi, B. und Hughes, C. (2000): Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export, *Nature* 405 [6789], Seite 914-9.
- [31] Vandeputte-Rutten, L.; Kramer, R. A.; Kroon, J.; Dekker, N.; Egmond, M. R. und Gros, P. (2001): Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site, *Embo J* 20 [18], Seite 5033-9.
- [32] Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N. und Bourne, P. E. (2000): The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res* 28 [1], Seite 235-42.
- [33] Jacoboni, I.; Martelli, P. L.; Fariselli, P.; De Pinto, V. und Casadio, R. (2001): Prediction of the transmembrane regions of beta-barrel membrane proteins with a neural network-based predictor, *Protein Sci* 10 [4], Seite 779-787.
- [34] Seshadri, K.; Garemyr, R.; Wallin, E.; von Heijne, G. und Elofsson, A. (1998): Architecture of beta-barrel membrane proteins: analysis of trimeric porins, *Protein Sci* 7 [9], Seite 2026-32.

- [35] Lesieur, C.; Vecsey-Semjen, B.; Abrami, L.; Fivaz, M. und Gisou van der Goot, F. (1997): Membrane insertion: The strategies of toxins (review), *Mol Membr Biol* 14 [2], Seite 45-64.
- [36] van der Goot, F. G. (2000): Plasticity of the transmembrane beta-barrel, *Trends Microbiol* 8 [3], Seite 89-90.
- [37] Tamm, L. K.; Arora, A. und Kleinschmidt, J. H. (2001): Structure and Assembly of beta -Barrel Membrane Proteins, *J Biol Chem* 276 [35], Seite 32399-402.
- [38] Matouschek, A. und Glick, B. S. (2001): Barreling through the outer membrane, *Nat Struct Biol* 8 [4], Seite 284-6.
- [39] Luecke, H.; Schobert, B.; Richter, H. T.; Cartailler, J. P. und Lanyi, J. K. (1999): Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J Mol Biol* 291 [4], Seite 899-911.
- [40] Kolbe, M.; Besir, H.; Essen, L. O. und Oesterhelt, D. (2000): Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution [see comments], *Science* 288 [5470], Seite 1390-6.
- [41] Luecke, H.; Schobert, B.; Lanyi, J. K.; Spudich, E. N. und Spudich, J. L. (2001): Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction, *Science* 293 [5534], Seite 1499-503.
- [42] Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M. und Miyano, M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor [see comments], *Science* 289 [5480], Seite 739-45.
- [43] Stowell, M. H.; McPhillips, T. M.; Rees, D. C.; Soltis, S. M.; Abresch, E. und Feher, G. (1997): Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer, *Science* 276 [5313], Seite 812-6.
- [44] Nogi, T.; Fathir, I.; Kobayashi, M.; Nozawa, T. und Miki, K. (2000): Crystal structures of photosynthetic reaction center and high-potential iron-sulfur protein from *Thermochromatium tepidum*: thermostability and electron transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [25], Seite 13561-6.
- [45] Deisenhofer, J.; Epp, O.; Sinning, I. und Michel, H. (1995): Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*, *J Mol Biol* 246 [3], Seite 429-57.
- [46] Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H. T.; Klukas, O.; Saenger, W. und Krauss, N. (2001): Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* 411 [6840], Seite 909-17.
- [47] Koepke, J.; Hu, X.; Muenke, C.; Schulten, K. und Michel, H. (1996): The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*, *Structure* 4 [5], Seite 581-97.
- [48] Prince, S. M.; Papiz, M. Z.; Freer, A. A.; McDermott, G.; Hawthornthwaite-Lawless, A. M.; Cogdell, R. J. und Isaacs, N. W. (1997): Apoprotein structure in the LH2 complex from *Rhodospseudomonas acidophila* strain 10050: modular assembly and protein pigment interactions, *J Mol Biol* 268 [2], Seite 412-23.
- [49] McLuskey, K.; Prince, S. M.; Cogdell, R. J. und Isaacs, N. W. (2001): The crystallographic structure of the B800-820 LH3 light-harvesting complex from the purple bacteria *Rhodospseudomonas acidophila* strain 7050, *Biochemistry* 40 [30], Seite 8783-9.
- [50] Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U. und Michel, H. (1997): Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two- subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [20], Seite 10547-53.

- [51] Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R. und Than, M. E. (2000): Structure and mechanism of the aberrant ba(3)-cytochrome c oxidase from *thermus thermophilus*, *Embo J* 19 [8], Seite 1766-76.
- [52] Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libeu, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T. und Tsukihara, T. (1998): Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase, *Science* 280 [5370], Seite 1723-9.
- [53] Abramson, J.; Riistama, S.; Larsson, G.; Jasaitis, A.; Svensson-Ek, M.; Laakkonen, L.; Puustinen, A.; Iwata, S. und Wikstrom, M. (2000): The structure of the ubiquinol oxidase from *escherichia coli* and its ubiquinone binding site [In Process Citation], *Nat Struct Biol* 7 [10], Seite 910-7.
- [54] Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ramaswamy, S. und Jap, B. K. (1998): Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex [see comments], *Science* 281 [5373], Seite 64-71.
- [55] Zhang, Z.; Huang, L.; Shulmeister, V. M.; Chi, Y. I.; Kim, K. K.; Hung, L. W.; Crofts, A. R.; Berry, E. A. und Kim, S. H. (1998): Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1, *Nature* 392 [6677], Seite 677-84.
- [56] Hunte, C.; Koepke, J.; Lange, C.; Rossmannith, T. und Michel, H. (2000): Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment, *Structure Fold Des* 8 [6], Seite 669-84.
- [57] Iverson, T. M.; Luna Chavez, C.; Cecchini, G. und Rees, D. C. (1999): Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex [see comments], *Science* 284 [5422], Seite 1961-6.
- [58] Lancaster, C. R.; Kroger, A.; Auer, M. und Michel, H. (1999): Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution, *Nature* 402 [6760], Seite 377-85.
- [59] Morais-Cabral, J. H.; Zhou, Y. und MacKinnon, R. (2001): Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter, *Nature* 414 [6859], Seite 37-42.
- [60] Chang, G.; Spencer, R. H.; Lee, A. T.; Barclay, M. T. und Rees, D. C. (1998): Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel, *Science* 282 [5397], Seite 2220-6.
- [61] Fu, D.; Libson, A.; Miercke, L. J.; Weitzman, C.; Nollert, P.; Krucinski, J. und Stroud, R. M. (2000): Structure of a glycerol- conducting channel and the basis for its selectivity [In Process Citation], *Science* 290 [5491], Seite 481-6.
- [62] Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J. B.; Engel, A. und Fujiyoshi, Y. (2000): Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, *Nature* 407 [6804], Seite 599-605.
- [63] Sui, H.; Han, B. G.; Lee, J. K.; Walian, P. und Jap, B. K. (2001): Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel, *Nature* 414 [6866], Seite 872-8.
- [64] Dutzler, R.; Campbell, E. B.; Cadene, M.; Chait, B. T. und MacKinnon, R. (2002): X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity, *Nature* 415 [6869], Seite 287-94.
- [65] Toyoshima, C.; Nakasako, M.; Nomura, H. und Ogawa, H. (2000): Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution [see comments], *Nature* 405 [6787], Seite 647-55.
- [66] Betanzos, M.; Chiang, C. S.; Guy, H. R. und Sukharev, S. (2002): A large iris-like expansion of a mechanosensitive channel protein induced by membrane tension, *Nat Struct Biol* 9 [9], Seite 704-10.

- [67] Arias, H. R. (1997): Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor, *Brain Res Brain Res Rev* 25 [2], Seite 133-91.
- [68] Brisson, A. und Unwin, P. N. (1985): Quaternary structure of the acetylcholine receptor, *Nature* 315 [6019], Seite 474-7.
- [69] Jentsch, T. J. (2002): Chloride channels are different, *Nature* 415 [6869], Seite 276-7.
- [70] Arora, A.; Abildgaard, F.; Bushweller, J. H. und Tamm, L. K. (2001): Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy, *Nat Struct Biol* 8 [4], Seite 334-8.
- [71] Watson, J. D. und Crick, F. H. (1974): Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. G.D. Watson and F.H.C. Crick. Published in *Nature*, number 4356 April 25, 1953, *Nature* 248 [451], Seite 765.
- [72] Liu, L. P. und Deber, C. M. (1998): Guidelines for membrane protein engineering derived from de novo designed model peptides, *Biopolymers* 47 [1], Seite 41-62.
- [73] Zhou, F. X.; Cocco, M. J.; Russ, W. P.; Brunger, A. T. und Engelman, D. M. (2000): Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins [see comments], *Nat Struct Biol* 7 [2], Seite 154-60.
- [74] Walther, D. und Argos, P. (1996): Intrahelical side chain-side chain contacts: the consequences of restricted rotameric states and implications for helix engineering and design, *Protein Eng* 9 [6], Seite 471-8.
- [75] Chothia, C.; Levitt, M. und Richardson, D. (1981): Helix to helix packing in proteins, *J Mol Biol* 145 [1], Seite 215-50.
- [76] MacKenzie, K. R. und Engelman, D. M. (1998): Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycoporphin A dimerization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [7], Seite 3583-90.
- [77] Pappu, R. V.; Marshall, G. R. und Ponder, J. W. (1999): A potential smoothing algorithm accurately predicts transmembrane helix packing, *Nat Struct Biol* 6 [1], Seite 50-5.
- [78] Wang, C. und Deber, C. M. (2000): Peptide mimics of the M13 coat protein transmembrane segment. Retention of helix-helix interaction motifs, *J Biol Chem* 275 [21], Seite 16155-9.
- [79] Kahn, T. W. und Engelman, D. M. (1992): Bacteriorhodopsin can be refolded from two independently stable transmembrane helices and the complementary five-helix fragment, *Biochemistry* 31 [26], Seite 6144-51.
- [80] Lemmon, M. A. und Engelman, D. M. (1994): Specificity and promiscuity in membrane helix interactions, *FEBS Lett* 346 [1], Seite 17-20.
- [81] Oesterhelt, F.; Oesterhelt, D.; Pfeiffer, M.; Engel, A.; Gaub, H. E. und Muller, D. J. (2000): Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins [see comments], *Science* 288 [5463], Seite 143-6.
- [82] Haltia, T. und Freire, E. (1995): Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins, *Biochim Biophys Acta* 1241 [2], Seite 295-322.
- [83] White, S. H. und Wimley, W. C. (1999): Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, Seite 319-65.
- [84] Spolar, R. S.; Ha, J. H. und Record, M. T., Jr. (1989): Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 [21], Seite 8382-5.
- [85] White, S. H.; Ladokhin, A. S.; Jayasinghe, S. und Hristova, K. (2001): How membranes shape protein structure, *J Biol Chem* 276 [35], Seite 32395-8.
- [86] Stowell, M. H. und Rees, D. C. (1995): Structure and stability of membrane proteins, *Adv Protein Chem* 46, Seite 279-311.

- [87] Adamian, L. und Liang, J. (2001): Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins, *J Mol Biol* 311 [4], Seite 891-907.
- [88] Ben-Tal, N. und Honig, B. (1996): Helix-helix interactions in lipid bilayers, *Biophys J* 71 [6], Seite 3046-50.
- [89] Batiza, A. F.; Rayment, I. und Kung, C. (1999): Channel gate! Tension, leak and disclosure, *Structure Fold Des* 7 [5], Seite R99-103.
- [90] Langosch (1999): Molekulare Erkennung zwischen membranständigen Proteindomänen - struktur- und zellbiologische Aspekte, *Biospektrum* 2, Seite 101-104.
- [91] Booth, P. J. und Curran, A. R. (1999): Membrane protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 9 [1], Seite 115-21.
- [92] Popot, J. L. und Engelman, D. M. (1990): Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model, *Biochemistry* 29 [17], Seite 4031-7.
- [93] Preissner, R.; Goede, A. und Frömmel, C. (1998): Dictionary of interfaces in proteins (DIP). Data bank of complementary molecular surface patches, *J Mol Biol* 280 [3], Seite 535-50.
- [94] Stevens, T. J. und Arkin, I. T. (2001): Substitution rates in alpha-helical transmembrane proteins, *Protein Sci* 10 [12], Seite 2507-17.
- [95] Jones, D. T.; Taylor, W. R. und Thornton, J. M. (1994): A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology, *Biochemistry* 33 [10], Seite 3038-49.
- [96] Bibi, E. und Kaback, H. R. (1990): In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [11], Seite 4325-9.
- [97] Popot, J. L.; Trehwella, J. und Engelman, D. M. (1986): Reformation of crystalline purple membrane from purified bacteriorhodopsin fragments, *Embo J* 5 [11], Seite 3039-44.
- [98] Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975): Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components, *J Cell Biol* 67 [3], Seite 852-62.
- [99] Bibi, E. (1998): The role of the ribosome-translocon complex in translation and assembly of polytopic membrane proteins, *Trends Biochem Sci* 23 [2], Seite 51-5.
- [100] Andrews, D. W. und Johnson, A. E. (1996): The translocon: more than a hole in the ER membrane?, *Trends Biochem Sci* 21 [10], Seite 365-9.
- [101] Beckmann, R.; Spahn, C. M.; Eswar, N.; Helters, J.; Penczek, P. A.; Sali, A.; Frank, J. und Blobel, G. (2001): Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome, *Cell* 107 [3], Seite 361-72.
- [102] Hamman, B. D.; Chen, J. C.; Johnson, E. E. und Johnson, A. E. (1997): The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane, *Cell* 89 [4], Seite 535-44.
- [103] Borel, A. C. und Simon, S. M. (1996): Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration, *Cell* 85 [3], Seite 379-89.
- [104] Hermansson, M.; Monne, M. und von Heijne, G. (2001): Formation of helical hairpins during membrane protein integration into the endoplasmic reticulum membrane. Role of the N and C-terminal flanking regions, *J Mol Biol* 313 [5], Seite 1171-9.
- [105] Gafvelin, G. und von Heijne, G. (1994): Topological "frustration" in multispanning *E. coli* inner membrane proteins, *Cell* 77 [3], Seite 401-12.
- [106] Monné, M.; Nilsson, I.; Elofsson, A. und von Heijne, G. (1999): Turns in transmembrane helices: determination of the minimal length of a "helical hairpin" and derivation of a fine-grained turn propensity scale, *J Mol Biol* 293 [4], Seite 807-14.

- [107] von Heijne, G. (1992): Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule, *J Mol Biol* 225 [2], Seite 487-94.
- [108] Charifson, P. S.; Shewchuk, L. M.; Rocque, W.; Hummel, C. W.; Jordan, S. R.; Mohr, C.; Pacofsky, G. J.; Peel, M. R.; Rodriguez, M.; Sternbach, D. D. und Con-sler, T. G. (1997): Peptide ligands of pp60(c-src) SH2 domains: a thermodynamic and structural study, *Biochemistry* 36 [21], Seite 6283-93.
- [109] Wiener, M. C. und White, S. H. (1992): Structure of a fluid dioleoylphosphatidyl-choline bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. II. Distribution and packing of terminal methyl groups, *Biophys J* 61 [2], Seite 428-33.
- [110] Caffrey, M. und Feigenson, G. W. (1981): Fluorescence quenching in model mem-branes. 3. Relationship between calcium adenosinetriphosphatase enzyme activity and the affinity of the protein for phosphatidylcholines with different acyl chain characteristics, *Biochemistry* 20 [7], Seite 1949-61.
- [111] Nezil, F. A. und Bloom, M. (1992): Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes, *Biophys J* 61 [5], Seite 1176-83.
- [112] Ren, J.; Lew, S.; Wang, Z. und London, E. (1997): Transmembrane orientation of hydrophobic alpha-helices is regulated both by the relationship of helix length to bi-layer thickness and by the cholesterol concentration, *Biochemistry* 36 [33], Seite 10213-20.
- [113] Pilot, J. D.; East, J. M. und Lee, A. G. (2001): Effects of bilayer thickness on the activity of diacylglycerol kinase of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 40 [28], Seite 8188-95.
- [114] Bretscher, M. S. und Munro, S. (1993): Cholesterol and the Golgi apparatus, *Science* 261 [5126], Seite 1280-1.
- [115] Webb, R. J.; East, J. M.; Sharma, R. P. und Lee, A. G. (1998): Hydrophobic mis-match and the incorporation of peptides into lipid bilayers: a possible mechanism for retention in the Golgi, *Biochemistry* 37 [2], Seite 673-9.
- [116] Orci, L.; Montesano, R.; Meda, P.; Malaisse-Lagae, F.; Brown, D.; Perrelet, A. und Vassalli, P. (1981): Heterogeneous distribution of filipin--cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 [1], Seite 293-7.
- [117] Mouritsen, O. G. und Bloom, M. (1993): Models of lipid-protein interactions in membranes, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, Seite 145-71.
- [118] Morrow, M. R.; Huschilt, J. C. und Davis, J. H. (1985): Simultaneous modeling of phase and calorimetric behavior in an amphiphilic peptide/phospholipid model membrane, *Biochemistry* 24 [20], Seite 5396-406.
- [119] Piknova, B.; Perochon, E. und Tocanne, J. F. (1993): Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesi-cles, *Eur J Biochem* 218 [2], Seite 385-96.
- [120] Bransburg-Zabary, S.; Nachliel, E. und Gutman, M. (1996): Utilization of monensin for detection of microdomains in cholesterol containing membrane, *Biochim Bio-phys Acta* 1285 [2], Seite 146-54.
- [121] Lewis, B. A. und Engelman, D. M. (1983): Bacteriorhodopsin remains dispersed in fluid phospholipid bilayers over a wide range of bilayer thicknesses, *J Mol Biol* 166 [2], Seite 203-10.
- [122] Simons, K. und Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes, *Nature* 387 [6633], Seite 569-72.

- [123] Monne, M. und von Heijne, G. (2001): Effects of 'hydrophobic mismatch' on the location of transmembrane helices in the ER membrane, *FEBS Lett* 496 [2-3], Seite 96-100.
- [124] Perozo, E.; Kloda, A.; Cortes, D. M. und Martinac, B. (2002): Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating, *Nat Struct Biol* 9 [9], Seite 696-703.
- [125] Ren, J.; Lew, S.; Wang, J. und London, E. (1999): Control of the transmembrane orientation and interhelical interactions within membranes by hydrophobic helix length, *Biochemistry* 38 [18], Seite 5905-12.
- [126] Sabra, M. C. und Mouritsen, O. G. (1998): Steady-state compartmentalization of lipid membranes by active proteins, *Biophys J* 74 [2 Pt 1], Seite 745-52.
- [127] Cornette, J. L.; Cease, K. B.; Margalit, H.; Spouge, J. L.; Berzofsky, J. A. und DeLisi, C. (1987): Hydrophobicity scales and computational techniques for detecting amphipathic structures in proteins, *J Mol Biol* 195 [3], Seite 659-85.
- [128] Rost, B.; Casadio, R. und Fariselli, P. (1996): Refining neural network predictions for helical transmembrane proteins by dynamic programming, *Ismb* 4, Seite 192-200.
- [129] Krogh, A.; Brown, M.; Mian, I. S.; Sjolander, K. und Haussler, D. (1994): Hidden Markov models in computational biology. Applications to protein modeling, *J Mol Biol* 235 [5], Seite 1501-31.
- [130] Persson, B. und Argos, P. (1994): Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments, *J Mol Biol* 237 [2], Seite 182-92.
- [131] Klevanik, A. V. (2001): Hydrophobicity and prediction of the secondary structure of membrane proteins and peptides, *Membr Cell Biol* 14 [5], Seite 673-97.
- [132] Beitz, E. (2000): T(E)Xtopo: shaded membrane protein topology plots in LAT(E)X2epsilon, *Bioinformatics* 16 [11], Seite 1050-1.
- [133] Gille, C. und Frommel, C. (2001): STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins, *Bioinformatics* 17 [4], Seite 377-8.
- [134] Moller, S.; Croning, M. D. und Apweiler, R. (2001): Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions, *Bioinformatics* 17 [7], Seite 646-53.
- [135] Mitaku, S.; Hirokawa, T. und Tsuji, T. (2002): Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces, *Bioinformatics* 18 [4], Seite 608-16.
- [136] Killian, J. A. und von Heijne, G. (2000): How proteins adapt to a membrane-water interface, *Trends Biochem Sci* 25 [9], Seite 429-34.
- [137] von Heijne, G. und Gavel, Y. (1988): Topogenic signals in integral membrane proteins, *Eur J Biochem* 174 [4], Seite 671-8.
- [138] Ballesteros, J. A. und Weinstein, H. (1992): Analysis and refinement of criteria for predicting the structure and relative orientations of transmembranal helical domains, *Biophys J* 62 [1], Seite 107-9.
- [139] Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. (2001): Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes, *J Mol Biol* 305 [3], Seite 567-580.
- [140] Cuff, J. A.; Clamp, M. E.; Siddiqui, A. S.; Finlay, M. und Barton, G. J. (1998): JPred: a consensus secondary structure prediction server, *Bioinformatics* 14 [10], Seite 892-3.
- [141] Nilsson, J.; Persson, B. und von Heijne, G. (2000): Consensus predictions of membrane protein topology, *FEBS Lett* 486 [3], Seite 267-9.
- [142] Wallin, E. und von Heijne, G. (1998): Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, *Protein Sci* 7 [4], Seite 1029-38.

- [143] Gafvelin, G.; Sakaguchi, M.; Andersson, H. und von Heijne, G. (1997): Topological rules for membrane protein assembly in eukaryotic cells, *J Biol Chem* 272 [10], Seite 6119-27.
- [144] Whitley, P.; Saaf, A.; Gafvelin, G.; Johansson, M.; Wallin, E. und von Heijne, G. (1995): Membrane protein anchors and polytopic determinants, *Biochem Soc Trans* 23 [4], Seite 965-7.
- [145] Jones, D. T.; Taylor, W. R. und Thornton, J. M. (1994): A mutation data matrix for transmembrane proteins, *FEBS Lett* 339 [3], Seite 269-75.
- [146] Schirmer, T. und Cowan, S. W. (1993): Prediction of membrane-spanning beta-strands and its application to maltoporin, *Protein Sci* 2 [8], Seite 1361-3.
- [147] Ladokhin, A. S.; Isas, J. M.; Haigler, H. T. und White, S. H. (2002): Determining the membrane topology of proteins: insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12, *Biochemistry* 41 [46], Seite 13617-26.
- [148] Saier, M. H., Jr. (2000): Families of proteins forming transmembrane channels, *J Membr Biol* 175 [3], Seite 165-80.
- [149] Saier, M. H., Jr. (2000): A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters, *Microbiol Mol Biol Rev* 64 [2], Seite 354-411.
- [150] Bairoch, A.; Bucher, P. und Hofmann, K. (1996): The PROSITE database, its status in 1995, *Nucleic Acids Res* 24 [1], Seite 189-96.
- [151] Froger, A.; Tallur, B.; Thomas, D. und Delamarche, C. (1998): Prediction of functional residues in water channels and related proteins, *Protein Sci* 7 [6], Seite 1458-68.
- [152] Finer-Moore, J. und Stroud, R. M. (1984): Amphipathic analysis and possible formation of the ion channel in an acetylcholine receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 [1], Seite 155-9.
- [153] Gromiha, M. M. und Ponnuswamy, P. K. (1996): Hydrophobic distribution and spatial arrangement of amino acid residues in membrane proteins, *Int J Pept Protein Res* 48 [5], Seite 452-60.
- [154] Doyle, D. A.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity [see comments], *Science* 280 [5360], Seite 69-77.
- [155] Zhai, Y. und Saier, M. H., Jr. (2001): A web-based program (WHAT) for the simultaneous prediction of hydropathy, amphipathicity, secondary structure and transmembrane topology for a single protein sequence, *J Mol Microbiol Biotechnol* 3 [4], Seite 501-2.
- [156] Soman, K. V.; McCammon, J. A. und Brown, A. M. (1995): Secondary structure prediction of the H5 pore of potassium channels, *Protein Eng* 8 [4], Seite 397-401.
- [157] Locher, K. P.; Lee, A. T. und Rees, D. C. (2002): The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism, *Science* 296 [5570], Seite 1091-8.
- [158] Donnelly, D.; Overington, J. P.; Ruffle, S. V.; Nugent, J. H. und Blundell, T. L. (1993): Modeling alpha-helical transmembrane domains: the calculation and use of substitution tables for lipid-facing residues, *Protein Sci* 2 [1], Seite 55-70.
- [159] Taylor, W. R.; Jones, D. T. und Green, N. M. (1994): A method for alpha-helical integral membrane protein fold prediction, *Proteins* 18 [3], Seite 281-94.
- [160] Stevens, T. J. und Arkin, I. T. (1999): Are membrane proteins "inside-out" proteins?, *Proteins* 36 [1], Seite 135-43.
- [161] Eilers, M.; Shekar, S. C.; Shieh, T.; Smith, S. O. und Fleming, P. J. (2000): Internal packing of helical membrane proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [11], Seite 5796-801.

- [162] Mitra, K.; Steitz, T. A. und Engelman, D. M. (2002): Rational design of 'water-soluble' bacteriorhodopsin variants, *Protein Eng* 15 [6], Seite 485-92.
- [163] Gouldson, P. R.; Dean, M. K.; Snell, C. R.; Bywater, R. P.; Gkoutos, G. und Reynolds, C. A. (2001): Lipid-facing correlated mutations and dimerization in G-protein coupled receptors, *Protein Eng* 14 [10], Seite 759-67.
- [164] Grasberger, B.; Minton, A. P.; DeLisi, C. und Metzger, H. (1986): Interaction between proteins localized in membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [17], Seite 6258-62.
- [165] Kaplan, W. und Littlejohn, T. G. (2001): Swiss-PDB Viewer (Deep View), *Brief Bioinform* 2 [2], Seite 195-7.
- [166] Pontius, J.; Richelle, J. und Wodak, S. J. (1996): Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures, *J Mol Biol* 264 [1], Seite 121-36.
- [167] Hirokawa, T.; Uechi, J.; Sasamoto, H.; Suwa, M. und Mitaku, S. (2000): A triangle lattice model that predicts transmembrane helix configuration using a polar jigsaw puzzle, *Protein Eng* 13 [11], Seite 771-8.
- [168] Bowie, J. U. (1999): Helix-bundle membrane protein fold templates, *Protein Sci* 8 [12], Seite 2711-9.
- [169] Senes, A.; Gerstein, M. und Engelman, D. M. (2000): Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, *J Mol Biol* 296 [3], Seite 921-36.
- [170] Gurezka, R.; Laage, R.; Brosig, B. und Langosch, D. (1999): A heptad motif of leucine residues found in membrane proteins can drive self-assembly of artificial transmembrane segments, *J Biol Chem* 274 [14], Seite 9265-70.
- [171] Kleiger, G.; Grothe, R.; Mallick, P. und Eisenberg, D. (2002): GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles, *Biochemistry* 41 [19], Seite 5990-7.
- [172] Vitkup, D.; Melamud, E.; Moulton, J. und Sander, C. (2001): Completeness in structural genomics, *Nat Struct Biol* 8 [6], Seite 559-66.
- [173] Aurora, R. und Rose, G. D. (1998): Helix capping, *Protein Sci* 7 [1], Seite 21-38.
- [174] Preissner, R. und Bork, P. (1991): On alpha-helices terminated by glycine. 1. Identification of common structural features, *Biochem Biophys Res Commun* 180 [2], Seite 660-5.
- [175] Forood, B.; Feliciano, E. J. und Nambiar, K. P. (1993): Stabilization of alpha-helical structures in short peptides via end capping, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [3], Seite 838-42.
- [176] Radford, S. E.; Dobson, C. M. und Evans, P. A. (1992): The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways, *Nature* 358 [6384], Seite 302-7.
- [177] Kabsch, W. und Sander, C. (1983): Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22 [12], Seite 2577-637.
- [178] Timischl, W (2000): Biostatistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner, 2. Auflage, Seite 340, Springer-Verlag Wien New York, Wien.
- [179] Belrhali, H.; Nollert, P.; Royant, A.; Menzel, C.; Rosenbusch, J. P.; Landau, E. M. und Pebay-Peyroula, E. (1999): Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution, *Structure Fold Des* 7 [8], Seite 909-17.
- [180] Tseitin, V. M. und Nikiforovich, G. V. (1999): Isolated transmembrane helices arranged across a membrane: computational studies, *Protein Eng* 12 [4], Seite 305-11.

- [181] Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J Mol Biol* 157 [1], Seite 105-32.
- [182] Essen, L.; Siegert, R.; Lehmann, W. D. und Oesterhelt, D. (1998): Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [20], Seite 11673-8.
- [183] Wallin, E.; Tsukihara, T.; Yoshikawa, S.; von Heijne, G. und Elofsson, A. (1997): Architecture of helix bundle membrane proteins: an analysis of cytochrome c oxidase from bovine mitochondria, *Protein Sci* 6 [4], Seite 808-15.
- [184] Mall, S.; Broadbridge, R.; Sharma, R. P.; Lee, A. G. und East, J. M. (2000): Effects of aromatic residues at the ends of transmembrane alpha-helices on helix interactions with lipid bilayers, *Biochemistry* 39 [8], Seite 2071-8.
- [185] Hunt, J. F.; Rath, P.; Rothschild, K. J. und Engelman, D. M. (1997): Spontaneous, pH-dependent membrane insertion of a transbilayer alpha-helix, *Biochemistry* 36 [49], Seite 15177-92.
- [186] Bechinger, B. (2001): Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a (15)N solid-state NMR spectroscopy investigation, *Biophys J* 81 [4], Seite 2251-6.
- [187] Ladokhin, A. S. und White, S. H. (1999): Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin, *J Mol Biol* 285 [4], Seite 1363-9.
- [188] Bywater, R. P.; Thomas, D. und Vriend, G. (2001): A sequence and structural study of transmembrane helices, *J Comput Aided Mol Des* 15 [6], Seite 533-52.
- [189] Bowie, J. U. (1997): Helix packing in membrane proteins, *J Mol Biol* 272 [5], Seite 780-9.
- [190] Chakrabarti, P. und Chakrabarti, S. (1998): C--H...O hydrogen bond involving proline residues in alpha-helices, *J Mol Biol* 284 [4], Seite 867-73.
- [191] Colonna-Cesari, F. und Sander, C. (1990): Excluded volume approximation to protein-solvent interaction. The solvent contact model, *Biophys J* 57 [5], Seite 1103-7.
- [192] Connolly, M. L. (1983): Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids, *Science* 221 [4612], Seite 709-13.
- [193] Preissner, R.; Goede, A. und Frömmel, C. (1999): Homonyms and synonyms in the Dictionary of Interfaces in Proteins (DIP), *Bioinformatics* 15 [10], Seite 832-6.
- [194] Tsai, J.; Taylor, R.; Chothia, C. und Gerstein, M. (1999): The packing density in proteins: standard radii and volumes, *J Mol Biol* 290 [1], Seite 253-66.
- [195] Goede, A.; Preissner, R. und Frömmel, C. (1997): Voronoi Cell: New Method for Allocation of Space among Atoms: Elimination of Avoidable Errors in Calculation of Atomic Volume and Density.
- [196] Dunbrack, R. L., Jr. und Karplus, M. (1994): Conformational analysis of the backbone-dependent rotamer preferences of protein sidechains, *Nat Struct Biol* 1 [5], Seite 334-40.
- [197] Ramachandran, G. N. und Sasisekharan, V. (1968): Conformation of polypeptides and proteins, *Adv Protein Chem* 23, Seite 283-438.
- [198] Morris, A. L.; MacArthur, M. W.; Hutchinson, E. G. und Thornton, J. M. (1992): Stereochemical quality of protein structure coordinates, *Proteins* 12 [4], Seite 345-64.
- [199] McGregor, M. J.; Islam, S. A. und Sternberg, M. J. (1987): Analysis of the relationship between side-chain conformation and secondary structure in globular proteins, *J Mol Biol* 198 [2], Seite 295-310.
- [200] White, S. H.; Wimley, W. C.; Ladokhin, A. S. und Hristova, K. (1998): Protein folding in membranes: determining energetics of peptide-bilayer interactions, *Methods Enzymol* 295, Seite 62-87.

- [201] Jeffrey, G. A. und Maluszynska, H. (1982): A survey of hydrogen bond geometries in the crystal structures of amino acids, *Int. J. Biol. Macromol.*, Seite 173-185.
- [202] Baker, E. N. und Hubbard, R. E. (1984): Hydrogen bonding in globular proteins, *Prog Biophys Mol Biol* 44 [2], Seite 97-179.
- [203] Preissner, R.; Egner, U. und Saenger, W. (1991): Occurrence of bifurcated three-center hydrogen bonds in proteins, *FEBS Lett* 288 [1-2], Seite 192-6.
- [204] Serrano, L. und Fersht, A. R. (1989): Capping and alpha-helix stability, *Nature* 342 [6247], Seite 296-9.
- [205] Cross, T. A.; Arseniev, A.; Cornell, B. A.; Davis, J. H.; Killian, J. A.; Koeppe, R. E., 2nd; Nicholson, L. K.; Separovic, F. und Wallace, B. A. (1999): Gramicidin channel controversy--revisited, *Nat Struct Biol* 6 [7], Seite 610-1; discussion 611-2.
[java/Propub/structbio/nsb0799_610.fulltext](#)
[java/Propub/structbio/nsb0799_610.abstract](#).
- [206] Braun, P. und von Heijne, G. (1999): The aromatic residues Trp and Phe have different effects on the positioning of a transmembrane helix in the microsomal membrane, *Biochemistry* 38 [30], Seite 9778-82.
- [207] Yuen, C. T.; Davidson, A. R. und Deber, C. M. (2000): Role of aromatic residues at the lipid-water interface in micelle-bound bacteriophage M13 major coat protein, *Biochemistry* 39 [51], Seite 16155-62.
- [208] Mishra, V. K. und Palgunachari, M. N. (1996): Interaction of model class A1, class A2, and class Y amphipathic helical peptides with membranes, *Biochemistry* 35 [34], Seite 11210-20.
- [209] Monné, M.; Nilsson, I.; Johansson, M.; Elmhed, N. und von Heijne, G. (1998): Positively and negatively charged residues have different effects on the position in the membrane of a model transmembrane helix, *J Mol Biol* 284 [4], Seite 1177-83.
- [210] Partridge, A. W.; Melnyk, R. A. und Deber, C. M. (2002): Polar Residues in Membrane Domains of Proteins: Molecular Basis for Helix-minus signHelix Association in a Mutant CFTR Transmembrane Segment, *Biochemistry* 41 [11], Seite 3647-53.
- [211] Engelman, D. M.; Steitz, T. A. und Goldman, A. (1986): Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins, *Annu Rev Biophys Chem* 15, Seite 321-53.
- [212] Holm, L. und Sander, C. (1996): Mapping the protein universe, *Science* 273 [5275], Seite 595-603.
- [213] Bowie, J. U. (2000): Understanding membrane protein structure by design [news; comment], *Nat Struct Biol* 7 [2], Seite 91-4.
- [214] Lazzaroni, J. C.; Vianney, A.; Popot, J. L.; Bénédicti, H.; Samatey, F.; Lazdunski, C.; Portalier, R. und Géli, V. (1995): Transmembrane alpha-helix interactions are required for the functional assembly of the Escherichia coli Tol complex, *J Mol Biol* 246 [1], Seite 1-7.
- [215] Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 47, Seite 45-148.
- [216] Barlow, D. J. und Thornton, J. M. (1988): Helix geometry in proteins, *J Mol Biol* 201 [3], Seite 601-19.
- [217] Li, S. C. und Deber, C. M. (1994): A measure of helical propensity for amino acids in membrane environments [see comments] [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1994 Aug;1(8):558], *Nat Struct Biol* 1 [6], Seite 368-73.
- [218] Senes, A.; Ubarretxena-Belandia, I. und Engelman, D. M. (2001): The Calpha --- H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [16], Seite 9056-61.

- [219] Fleishman, S. J. und Ben-Tal, N. (2002): A novel scoring function for predicting the conformations of tightly packed pairs of transmembrane alpha-helices, *J Mol Biol* 321 [2], Seite 363-78.
- [220] Lomize, A. L.; Pogozheva, I. D. und Mosberg, H. I. (1999): Structural organization of G-protein-coupled receptors, *J Comput Aided Mol Des* 13 [4], Seite 325-53.
- [221] Brandl, C. J. und Deber, C. M. (1986): Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 [4], Seite 917-21.
- [222] Nilsson, I. und von Heijne, G. (1998): Breaking the camel's back: proline-induced turns in a model transmembrane helix, *J Mol Biol* 284 [4], Seite 1185-9.
- [223] Collinge, J. (2001): PRION DISEASES OF HUMANS AND ANIMALS: Their Causes and Molecular Basis, *Annu Rev Neurosci* 24, Seite 519-550.
- [224] Wigley, W. C.; Corboy, M. J.; Cutler, T. D.; Thibodeau, P. H.; Oldan, J.; Lee, M. G.; Rizo, J.; Hunt, J. F. und Thomas, P. J. (2002): A protein sequence that can encode native structure by disfavoring alternate conformations, *Nat Struct Biol* 9 [5], Seite 381-8.
- [225] Frommel, C. und Preissner, R. (1990): Prediction of prolyl residues in cis-conformation in protein structures on the basis of the amino acid sequence, *FEBS Lett* 277 [1-2], Seite 159-63.
- [226] Tieleman, D. P.; Shrivastava, I. H.; Ulmschneider, M. R. und Sansom, M. S. (2001): Proline-induced hinges in transmembrane helices: Possible roles in ion channel gating, *Proteins* 44 [2], Seite 63-72.
- [227] Farrens, D. L.; Altenbach, C.; Yang, K.; Hubbell, W. L. und Khorana, H. G. (1996): Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin, *Science* 274 [5288], Seite 768-70.
- [228] Nilsson, I.; Saaf, A.; Whitley, P.; Gafvelin, G.; Waller, C. und von Heijne, G. (1998): Proline-induced disruption of a transmembrane alpha-helix in its natural environment, *J Mol Biol* 284 [4], Seite 1165-75.
- [229] Lu, Z. L. und Hulme, E. C. (2000): A network of conserved intramolecular contacts defines the off-state of the transmembrane switch mechanism in a seven-transmembrane receptor, *J Biol Chem* 275 [8], Seite 5682-6.
- [230] Fleming, P. J. und Richards, F. M. (2000): Protein packing: dependence on protein size, secondary structure and amino acid composition, *J Mol Biol* 299 [2], Seite 487-98.
- [231] Adamian, L. und Liang, J. (2002): Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: Polar clamps and serine zippers, *Proteins* 47 [2], Seite 209-18.
- [232] Rees, D. C.; Komiya, H.; Yeates, T. O.; Allen, J. P. und Feher, G. (1989): The bacterial photosynthetic reaction center as a model for membrane proteins, *Annu Rev Biochem* 58, Seite 607-33.
- [233] Rees, D. C. und Eisenberg, D. (2000): Turning a reference inside-out: commentary on an article by Stevens and Arkin entitled: 'Are membrane proteins 'inside-out' proteins?' (Proteins 1999;36:135-143) [comment], *Proteins* 38 [2], Seite 121-2.
- [234] Preissner, R.; Goede, A. und Frommel, C. (1999): Spare parts for helix-helix interaction, *Protein Eng* 12 [10], Seite 825-32.
- [235] Pebay-Peyroula, E. und Rosenbusch, J. P. (2001): High-resolution structures and dynamics of membrane protein--lipid complexes: a critique, *Curr Opin Struct Biol* 11 [4], Seite 427-32.
- [236] Tsai, J. und Gerstein, M. (2002): Calculations of protein volumes: sensitivity analysis and parameter database, *Bioinformatics* 18 [7], Seite 985-95.

- [237] Shenkin, P. S.; Farid, H. und Fetrow, J. S. (1996): Prediction and evaluation of side-chain conformations for protein backbone structures, *Proteins* 26 [3], Seite 323-52.
- [238] Iyer, L. K. und Vishveshwara, S. (1996): The stability of transmembrane helices: a molecular dynamics study on the isolated helices of bacteriorhodopsin, *Biopolymers* 38 [3], Seite 401-21.
- [239] Gratkowski, H.; Lear, J. D. und DeGrado, W. F. (2001): Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [3], Seite 880-5.
- [240] Dawson, J. P.; Weinger, J. S. und Engelman, D. M. (2002): Motifs of Serine and Threonine can Drive Association of Transmembrane Helices, *J Mol Biol* 316 [3], Seite 799-805.
- [241] Brosig, B. und Langosch, D. (1998): The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues, *Protein Sci* 7 [4], Seite 1052-6.
- [242] Kubatzky, K. F.; Ruan, W.; Gurezka, R.; Cohen, J.; Ketteler, R.; Watowich, S. S.; Neumann, D.; Langosch, D. und Klingmuller, U. (2001): Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor, *Curr Biol* 11 [2], Seite 110-5.
- [243] Koehl, P. und Levitt, M. (1999): Structure-based conformational preferences of amino acids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [22], Seite 12524-9.
- [244] Koradi, R.; Billeter, M. und Wuthrich, K. (1996): MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J Mol Graph* 14 [1], Seite 51-5, 29-32.
- [245] Schrauber, H.; Eisenhaber, F. und Argos, P. (1993): Rotamers: to be or not to be? An analysis of amino acid side-chain conformations in globular proteins, *J Mol Biol* 230 [2], Seite 592-612.
- [246] MacArthur, M. W. und Thornton, J. M. (1993): Conformational analysis of protein structures derived from NMR data, *Proteins* 17 [3], Seite 232-51.
- [247] Stapley, B. J. und Doig, A. J. (1997): Free energies of amino acid side-chain rotamers in alpha- helices, beta-sheets and alpha-helix N-caps, *J Mol Biol* 272 [3], Seite 456-64.
- [248] Duneau, J. P.; Garnier, N. und Genest, M. (1997): Insight into signal transduction: structural alterations in transmembrane helices probed by multi-1 ns molecular dynamics simulations, *J Biomol Struct Dyn* 15 [3], Seite 555-72.
- [249] Deisenhofer, J.; Epp, O.; Miki, K.; Huber, R. und Michel, H. (1984): X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*, *J Mol Biol* 180 [2], Seite 385-98.
- [250] Heinz, D. W.; Baase, W. A.; Dahlquist, F. W. und Matthews, B. W. (1993): How amino-acid insertions are allowed in an alpha-helix of T4 lysozyme, *Nature* 361 [6412], Seite 561-4.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturmodell des Natriumkanals von <i>Streptomyces lividans</i> (1jvm) [5].....	7
Abbildung 2: Die beiden vorherrschenden Strukturmotive bei Membranproteinen.....	8
Abbildung 3: Maltoporin in der Seitenansicht und ein Porintrimer in der Aufsicht (2mpr)	11
Abbildung 4: Kristallstruktur des Halorhodopsin als Protein- Lipid- Wasserkomplex (1e12).	14
Abbildung 5: Der bakterielle Lichtsammelnde Komplex in verschiedenen Ansichten (1lgh).....	15
Abbildung 6: Helix Dipole bilden einen Teil des Selektivitätsfilters beim Chloridkanal (1kpl, 1kpk).....	16
Abbildung 7: Die Untereinheiten der Oxidoreduktase sind unterschiedlichen Ursprungs (1occ)	17
Abbildung 8: Die Assemblierung der Oxidoreduktase („Drei Phasen Modell“, 1occ).....	18
Abbildung 9: Der Ribosom- Translokation Komplex von Hefe [101]	19
Abbildung 10: Strukturmodell des Sec 61 (Ribosom Komplexes) [101].....	20
Abbildung 11: Die Ladungsdichte entlang der Membrannormalen [83]	21
Abbildung 12: Der directionale Transport von Membranproteinen im Golgi Apparat [115].....	22
Abbildung 13: Protein- Lipidkomplex beim Bakteriorhodopsin (1qhj)	23
Abbildung 14: Öffnungsmechanismus beim mechanosensitiven Ionenkanal (1msl).....	24
Abbildung 15: Helixdipole im Kanal des Aquaporin von <i>E. coli</i> . (1fx8)	25
Abbildung 16: Die Topologie von Membranproteinen [132].....	26
Abbildung 17: Ein “helical hairpin” mit unterschiedlich geladenen Loops (1c3w)	27
Abbildung 18: Ergebnisausgabe des Vorhersageprogramms THMMH [139].....	28
Abbildung 19: Topologie bei <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. elegans</i> [139].....	29
Abbildung 20: Homologiemodell eines Prion β - barrel Kanalproteins.....	30
Abbildung 21: Analyse der Primärstruktur der Kaliumkanals (1k4c) mit WHAT [155].....	31
Abbildung 22: TM-Abschnitt eines ABC-Transportproteins (117v).....	32
Abbildung 23: Vektorielle Darstellung konservierter TM-Helixbereiche [160].....	33
Abbildung 24: Modellierung von Membranproteinen (Übersicht)	34
Abbildung 25: Homologiemodellierung und Target- Template Sequenzidentität [172].....	35
Abbildung 26: Helix 6 des Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w)	37
Abbildung 27: Analyse eines Caps am Beispiel der Untereinheit K des Cytochromes bcl (1be3)	38
Abbildung 28: Die Festlegung der Membrangrenzen (Übersicht)	40
Abbildung 29: Aromatengürtel (grün) bei dem β - Barrel FhuA (1by5) und dem Kaliumkanal (1bl8).....	41
Abbildung 30: Modellierung des Membraninterfaces mit Hilfe von H-Brücken (1c3w)	42
Abbildung 31: Patchform in Abhängigkeit vom Cut off [93].....	43
Abbildung 32: Übersicht der Analyse der Zusammensetzung helikaler TM-Abschnitte.....	44
Abbildung 33: Haupt- und Seitenkettenwinkel einer α -Helix.....	46
Abbildung 34: Die Nomenklatur der Seitenkettenrotamere.....	47
Abbildung 35: Helix 2 von Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w):.....	49
Abbildung 36: Helix 3 von Bakteriorhodopsin (C-Cap) (1c3w)	50
Abbildung 37: Der N-Terminus von Bakteriorhodopsin (N-Cap) (1c3w)	51
Abbildung 38: Helix 2 von Bakteriorhodopsin (N-Cap) (1c3w)	56
Abbildung 39: Helixcaps im Bakteriorhodopsin (1c3w).....	57
Abbildung 40: Ausschnitt aus dem Strukturalignment (FSSP) von Bakteriorhodopsin (1c3w).....	59
Abbildung 41: Maße der verwendeten TM-Helices	61
Abbildung 42: „Typische Helix“ eines globulären (5nul) und eines TM-Proteins (1be3)	62
Abbildung 43: Aminosäurehäufigkeiten von Transmembran Domänen.....	64
Abbildung 44: Pro und Gly in Bakteriorhodopsin (1c3w).....	65
Abbildung 45: Pro induzierte geometrische Restriktionen in einer α -Helix:	66
Abbildung 46: Pro in verschiedenen Positionen im Rinder Rhodopsin (1f88)	67
Abbildung 47: Bevorzugte Aminosäurepositionen in Membranhelices [136]	68
Abbildung 48: (a) Transversale und (b) longitudinale Polarität der Aminosäurenverteilung α -helikaler Membrandomänen.....	73
Abbildung 49: Mögliche Kräfte zur Stabilisierung eines Membranproteins	74
Abbildung 50: Helices mit negativen Kreuzungswinkeln in Glycophorin A und beim Kaliumkanal.....	75
Abbildung 51: Protein- und Solvent- Kontakte von Helix 5 und 6 im Sensory Rhodopsin (1jgj)	76
Abbildung 52: Ramachandran Plot von TM-Helices und langer Helices globulärer Proteine.....	77
Abbildung 53: Vergleich der relativen Verteilung der ϕ - und ψ -Winkel.....	80
Abbildung 54: Unterschiedliche Besetzung von Seitenkettenrotameren in TM-Helices.....	81
Abbildung 55: Torsionswinkel unterschiedlich besetzter Seitenkettenrotamere.....	82
Abbildung 56: Gegabelte Wasserstoffbrücken in TM-Helices und Helices globulärer Proteine	84
Abbildung 57: Überlagerung einer TM-Helix mit der Helix eines globulären Proteins	87
Abbildung 58: Geometrische Besonderheiten α -helikaler TM-Abschnitte.....	88

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Wichtige Eigenschaften der cytosolischen und der Membranumgebung für die Proteinfaltung.....</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 2: Bekannte β-Barrel Strukturen</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 3: Verwendeter Datensatz hoch aufgelöster nicht homologer α-helikaler Membranproteine</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 4: Eintragung der Analysemerkmale der Helixcaps in eine Vierfeldertafel</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 5: Korrekturfaktor zur Normalisierung des Anteils an den Kontakten</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 6: Aminosäurepräferenzen für die verschiedenen N-Cap Positionen von Turn-Helix Motiven.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabelle 7: Aminosäurepräferenzen in den verschiedenen C-Cap Positionen von Helix-Turn Motiven</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 8: Wichtige Hydrophobizitätsscalen zur Beurteilung der Wasserlöslichkeit von Aminosäuren</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 9: Koordinaten der Membranebenenpunkte</i>	<i>60</i>
<i>Tabelle 10: Aminosäurezusammensetzung von Membranproteinen und Helices globulärer Proteine:</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 11: Aminosäurezusammensetzung unterschiedlicher Kontaktflächen in Membran- und globulären Proteinen (s. a. Legende Tabelle 14)</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 12: Aminosäuren α-helikaler Transmembrandomänen nach Kontaktpräferenzen geclustert</i>	<i>70</i>
<i>Tabelle 13: Packungsdichte α-helikaler Membrandomänen in Abhängigkeit vom gewählten Cut Off.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 14: Atomzusammensetzung helikaler Kontaktflächen in Membranproteinen und wasserlöslichen globulären Proteinen</i>	<i>72</i>
<i>Tabelle 15: Torsionswinkel der verwendeten helikalen TM-Abschnitte</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 16: Torsionswinkel der verwendeten helikalen TM-Abschnitte (Fortsetzung).....</i>	<i>79</i>
<i>Tabelle 17: Durch Pro verursachte geometrische Besonderheiten in den untersuchten TM-Helices:</i>	<i>85</i>

Lebenslauf

NAME, VORNAME:	Hildebrand, Peter
GEBURTSDATUM:	14.11.1968
GEBURTSORT:	Burglengenfeld
FAMILIENSTAND:	nicht verheiratet
ADRESSE:	Pappelallee 22, 10437 Berlin
TELEPHON: ARB.	030/450 52 82 12
PRIV.	030/447 31 86 3

Schulausbildung:

1975-1979	<i>Geschwister Scholl Schule, Burglengenfeld</i>
1979-1988	<i>Johann Michael Fischer Gymnasium, Burglengenfeld</i>
1988	<i>Abitur</i>

Hochschulausbildung:

1989-1997	<i>Biologiestudium an der Universität Regensburg</i>
1990	<i>Diplom Vorprüfung</i>
1993-1994	<i>Praktikum an dem Instituto de Recursos naturales y alimentación de Sevilla</i>
1997	<i>Diplomhauptprüfung</i>
1997-1998	<i>Diplomarbeit am Fachbereich Ökologie der Humboldt-Universität Berlin</i>
1998	<i>erfolgreiche Diplomverteidigung</i>

Graduiertenausbildung:

1999-2002	<i>Förderung durch den Graduiertenkolleg Modellstudien zu Struktur, Eigenschaften und Erkennung Biologischer Moleküle auf Atomarer Ebene</i>
1999-2003	<i>Bearbeitung des Promotionsthemas: Zur Strukturvorhersage der Membranproteine: Vergleich der Raumstrukturcharakteristika von Membranproteinen und globulären Proteinen</i>

Berlin, den 19.07.2003

Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei meinen Kollegen bedanken, deren freundliche Tips und kritische Betrachtungen, mich beim Erstellen dieser Arbeit stets vorwärts gebracht haben. Mein ganz besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Cornelius Frömmel und Dr. Robert Preissner, für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Bei Dr. Andrean Goede möchte ich mich für die freundliche Kooperationsbereitschaft in Bezug auf die von ihm erstellten, benutzerfreundlichen Analysetools herzlich bedanken. Dem Graduiertenkolleg bin ich für die finanzielle Unterstützung während des Erstellens meiner Dissertation zum Dank verpflichtet. Meiner Familie danke ich für die vielfältige Hilfe, die mir während der gesamten Zeit meiner wissenschaftlichen Ausbildung zu Teil wurde.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich bin mit der Auslage meiner Doktorarbeit in der Bibliothek der Humboldt- Universität zu Berlin einverstanden.

Berlin, den 19.07.2003,

Peter Hildebrand